Aus der Universitäts-Strahlenklinik Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. R. du Mesnil de Rochemont

Das Verhalten der Antikörper-bildenden Milzzellen bei der Maus nach Bestrahlung und unspezifischer Stimulierung mit Aluminium-Hydroxid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Henning Röseler

aus Bremen

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus der Universitäts-Strahlenklinik Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. R. du Mesnil de Rochemont

Das Verhalten der Antikörper-bildenden Milzzellen bei der Maus nach Bestrahlung und unspezifischer Stimulierung mit Aluminium-Hydroxid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Henning Röseler

aus Bremen

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 29.5.1969

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson
Referent: Prof. Dr. med. R. du Mesnil de Rochemont
Correferent: Prof. Dr. med. F. Hess

Meiner Frau

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534924_0007

Übersicht

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Der Einfluß energiereicher Ganzkörper bestrahlung und unspezifischer Adiuvantien auf die Antikörperbildung	1 -- 2
1.2	Der Strahleninsult durch Vor- und durch Nachbestrahlung	2 - 8
1.3	Die sogenannte unspezifische Stimulierung der Ak-Bildung	8 - 10
1.4	Fragestellung	11
2.	Methodik	12
2.1	Allgemeines	12 - 13
2.2	Methodische Voraussetzungen	14 - 16
2.3	Material und Technik	16 - 20
3.	Ergebnisse	21
3.1	Untersuchungen zur Methode	21 - 26
3.2	Plaque- und Titerkinetik nach Ag-Gabe (s. Kurve 1)	26 - 28
3.3	Plaque- und Titerkinetik nach Vorbestrahlung (s. Kurve 2)	28 - 30
3.4	Plaque- und Titerkinetik bei Nachbestrahlung (s. Kurve 3)	30 - 32
3.5	Plaque- und Titerkinetik nach unspezifischer Vorstimulierung (s. Kurve 4)	32 - 34
3.6	Plaque- und Titerkinetik nach kombinierter Vorbehandlung (s. Kurve 5)	35 - 37

Seite

4. Diskussion 38 - 39

4.1 Die "natürliche Plaquesbildung" 38 - 39

4.2 19S-Hämolysin-resistente Erythrozyten 39 - 40

4.3 Plaquestruktur und Plaquezellen 40 - 44

4.4 Plaque- und Titerkinetik nach Ag-Gabe (Serie 1, s. 3.2) 44 - 55

4.5 Der Einfluß der Vor- und Nachbestrahlung auf die Plaque- und Titer-Kinetik (Serie 2, s. 3.3 und Serie 3, s. 3.4) 55 - 62

4.6 Der Einfluß des unspezifischen Stimulans GAH auf die Plaque- und Titerkinetik (Serie 4, s. 3.5 und Serie 5, s. 3.6) 62 - 67

5. These 68

6. Zusammenfassung 69 - 70

7. Literatur 71 - 79

8. Danksagung 80

9. Lebenslauf 80 - 81

1. Einleitung

1.1 Der Einfluß energiereicher Ganzkörperbestrahlung und unspezifischer Adiuvantien auf die Antikörperbildung

Als immunologischer Strahlenschaden wird im folgenden die hemmende Wirkung einer Ganzkörperbestrahlung (GKB) mit Röntgen- oder Gammastrahlen auf gewisse Phasen des Funktions- und Gestaltwandels im lymphoretikulären Gewebe nach Sensibilisierung verstanden. Dabei werden die einzelnen Reaktionsschritte innerhalb der Phasen der Antigen(Ag)-Aufschlüsselung, der Induktion immunologisch kompetenter Zellen und ihrer Proliferation und Transformation zu Antikörper(Ak)-bildenden Zellen in ganz unterschiedlichem Ausmaß betroffen (1-3).

Das für den Organismus immunologisch repräsentative Organ ist beim Säugetier die Milz. Durch Bestimmung der Gesamtzellzahl, des absoluten und relativen Anteils Ak-bildender Gewebselemente, der gleichzeitig im Serum erscheinenden Ak-Titer sowie des zeitlichen Ganges dieser Veränderungen wird der Immunprozeß in erster Näherung quantitativ faßbar und eine fragliche Strahlenschädigung beurteilbar.

Der Strahleninsult nach energiereicher GKB einer vorgegebenen Dosierung wird von zahlreichen zusätzlichen Faktoren wie z.B. Tierspecies, Ag-Typ und -dosierung, sogen. unspezifischen Adiuvantien und dem Verhältnis des Bestrahlungszeitpunktes zur Ag-Gabe beeinflußt.

Für die letztere dieser unabhängigen Variablen (4) ist in Bezug auf den Zeitpunkt der Ag-Gabe eine Vor- und eine Nachbe-

strahlung zu unterscheiden.-Schon seit einigen Jahrzehnten sind bedeutende quantitative Wirkungsunterschiede beider Bestrahlungsarten in dem Sinne bekannt, daß Vorbestrahlung zu einer stärkeren Schädigung der Immunreaktionen führt als Nachbestrahlung (5,6). Daraus wurde eine größere Strahlenresistenz des sensibilisierten Organismus im Vergleich zum nicht sensibilisierten abgeleitet. Andererseits läßt sich durch Verabfolgung unspezifischer Adiuvantien wie Kohle- (7), Tusche- (7), Kaolin- (7) und (7) Zymosansuspensionen der Organismus in einen Zustand geringerer Strahlensensibilität seines lymphoreticulären Gewebes überführen. Diese Substanzen haben außerdem die Eigenschaft, spezifische Immunreaktionen zu stimulieren (8).

In der vorgelegten Arbeit soll erstmals mithilfe der in den letzten Jahren entwickelten Agar-Plaque-Technik nach Jerne (9) das Verhalten des sensibilisierten Organismus gegenüber Vor- und Nachbestrahlung, unspezifischer Vorstimulierung und einer kombinierten Vorbehandlung auf der zellulären Ebene untersucht werden. Als Modell dient ein gegen Schaferythrozyten gerichtetes hämolytisches System der Maus; als abhängige Variable wurde die Kinetik der Ak-bildenden Milzzellen und der Serumhämolysine aufgrund der sogen. absoluten und relativen Plaquezahlen bzw. der Hämolysin-Titer bestimmt. Als unspezifisches Immunstimulans wurde das Impfstoffadiuvans Gamma-Aluminium-Hydroxid verwendet.

1.2 Der Strahleninsult durch Vor- und durch Nachbestrahlung

Grundlegende Beobachtungen wurden am Kaninchen bereits in den ersten Jahren nach der Jahrhundertwende gemacht: GKB mit

30 - 40 XE (ungefähr 2000 R) innerhalb von 2 - 4 Tagen vor Sensibilisierung mit Rinderalbumin senkte den Präcipitin-Titer und verzögerte die Ag-Clearence, während die gleiche Dosis am 4. Tage nach Ag-Gabe im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikante Wirkung zeigte (5) -. Prinzipiell Gleiches wurde später an Kaninchen (6), Mäusen (10) und Ratten (11) bei der Lysin- und Agglutininbildung gegen abgetötete Mikroorganismen bzw. Fremd-Erythrozyten beobachtet.Der in den vorausgegangenen Jahren durch zahlreiche Untersuchungen bestätigte Befund einer relativ zu anderen Körpergeweben großen Strahlensensibilität lymphoretikulären Gewebes in Thymus, Milz und Lymphknoten (12) führte zur Annahme einer wesentlichen Bedeutung dieser Organe zumindestens für die initialen Reaktionsschritte des Immunprozesses (13,14). Die unter dieser Hypothese zwischen 1915 und 1920 angestellten Versuche (15) mit zahlreichen Dosen im subletalen Bereich und detaillierter Wahl des zeitlichen Abstandes zwischen Bestrahlung und Ag-Gabe stellte nicht nur wiederum für serologische, sondern auch erstmals für histo- und hämatologische Parameter die größere Wirkung der Vor- gegenüber der Nachbestrahlung heraus. Während etwa Vorbestrahlung die Hämolysinbildung bei Ratte und Hund hinauszögerte, senkte oder vollständig blockierte, war durch Bestrahlung zu bestimmten zeitlichen Mindestabständen nach Ag-Gabe gegenüber den Kontrollen keine Wirkung zu erzielen. Parallel zur dosisabhängigen Normalisierung der Ak-Bildung verlief die Repopulation der untersuchten Ak-Bildungsstätten mit bestimmten zellulären Elementen. Von einer Schädigung durch Nachbestrahlung war erst zu sprechen, als es gelang, durch Bestrahlung innerhalb jeweils speziesabhängiger, verschieden kurzfristiger Intervalle nach Ag-Gabe einen Strahlen-

insult zu bewirken. Daraus wurde auf eine im Vergleich zu den strahlenresistenteren späteren Schritten des Immunprozesses größere Radiosensibilität der initialen Immunvorgänge geschlossen (16,17). Neben dem Wesen des Wirkungsunterschiedes zwischen Vor- und Nachbestrahlung war diese frühe radiosensible Phase mit ihrer zeitlichen Abgrenzung, Dosisabhängigkeit und zytologischen Charakterisierung Gegenstand zahlreicher Fragestellungen.

Auf den inzwischen wesentlich besseren methodischen Grundlagen der exakten Dosimetrie und empfindlicheren Serologie wurde seit 1948 diesen Einzelfragen zunächst bei der Ratte, später bei Kaninchen und Maus mit löslichen und partikulären Agg, kleineren zeitlichen Intervallen zwischen Bestrahlung und Ag-Gabe bzw. umgekehrt an Einzeldosen und Fraktionierungen über einen großen Dosisbereich für den Primär- und Sekundärprozeß (booster) meist durch Bestimmung der Serumtiterverläufe intensive Arbeit gewidmet (Übersicht s. 1). Die zahlreichen Einzelergebnisse lassen sich etwa folgendermaßen zusammenfassen:

1.2.1 Die abhängigen serologischen Variablen Latenzzeit, Steilheit und Dauer des Titeranstiegs zum Maximum sowie dessen Wert werden bei gegebener Strahlendosis in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt unterschiedlich stark beeinflußt. Als kritische Phasen sind abgrenzbar:

1.2.1.1 50. Tag - 12. Stunde vor Ag-Gabe: Bestrahlung innerhalb dieses Zeitraumes wird von einer mit der Kürze des Abstandes zur Ag-Gabe sich bis zur völligen Immunsuppression steigernden Hemmung aller Parameter gefolgt.

1.2.1.2 Wenige Stunden vor und nach Ag-Gabe: Artspezifische Unterschiede der Strahlenempfindlichkeit sind deutlicher. Verlängerung der Latenzzeit, Verringerung der Steilheit der Titerentwicklung mit Senkung, Hebung oder Konstanz des maximalen Titerwertes sind typisch.

1.2.1.3 Nach dem zweiten Tage nach Ag-Gabe: Die Titerverläufe sind im allgemeinen weniger stark beeinflußt, indem nur eine Verzögerung oder Verlangsamung mit oder ohne geringe Titersenkung oder sogar Erhöhung des Titermaximums (sog. Enhencement) eintreten.

1.2.2 Die beschriebenen Strahlenwirkungen sind erst oberhalb eines bestimmten artabhängigen Dosisbereiches nachweisbar und dann in komplizierter Weise stetig dosisabhängig.

1.2.3 Für die abhängigen Variablen gilt, daß mit wachsender Verkürzung des Intervalls zwischen Ag-Gabe und Nachbestrahlungszeitpunkt zuerst die Latenzzeit - bei einigen Arten sogar unter anfänglicher Erhöhung des Titermaximums - dann die Steilheit des Titeranstiegs und schließlich die übrigen Parameter (Zeitpunkt und Wert des Maximums, Titer-Integral des beobachteten Zeitraums etc.) in der Weise beeinflußt werden, daß nach Übergang zur Vorbestrahlung zunächst eine exzessive Hemmung aller Werte eintritt, die dann bei Verlängerung des Intervalls wiederum allmählich wieder abnimmt. Trägt man für verschiedene Strahlendosen jeden der 4 Parameter einzeln gegen mehrere Vor- und Nachbestrahlungsintervalle auf, so stellt sich die Steilheit dieser Hemmungskurven bei steigenden Dosen besonders im kurzen Bereich vor und nach Ag-Gabe zunehmend deutlich dar.

1.2.4 Unabhängige Variable des Organismus (Inzuchtstamm, Alter) und des Ag (Typ, Dosis, Dosierungsschema und Applikationsweise) sind im einzelnen festzulegen und ihre für eine optimale Immunreaktion und deren Reproduzierbarkeit günstigsten Größen jeweils empirisch zu ermitteln (4).

1.2.5 Unter Beachtung der angedeuteten Besonderheiten eines jeden immunologischen Modells hat sich dank der großen Strahlenresistenz von Ag und Ak die Beeinflussung des Immunprozesses von seinem zellulären Substrat her durch die exakt dosierbare und kurzfristig anwendbare Variable der energiereichen Bestrahlung als eine sehr fruchtbare Methode zur zeitlichen und kausalen Analyse erwiesen.

1.2.6 Nach der Strahlenempfindlichkeit seiner Teilreaktionen sind folgende Phasen des Immunprozesses abgrenzbar (3,18).

1.2.6.1 Latenzphase: Nach Spezies, Ag-und Ak-Typ etc. verschieden langer Zeitraum zwischen Ag-Gabe und erstem Auftreten titrierbarer Ak-Mengen im Serum. Einer Präinduktiven Phase von ungefähr 1 - 4 Stunden maximaler Strahlenempfindlichkeit folgt eine Induktionsphase, innerhalb derer Bestrahlung mit subletalen und mittleren Letalitätsdosen nur zu einer Verzögerung des Titeranstiegs, in Einzelfällen (Kaninchen) mit einer Erhöhung des Titermaximums (Enhencement) führt. Die zellulären Vorgänge bestehen in der Ingestion (Phagozytose, Pinozytose) und Digestion des Ag durch Makrophagen; diese Funktionen sind Voraussetzung der Ag-Aufschlüsselung

und der anschließenden Informationsübertragung auf immunologisch kompetente Zellen.

1.2.6.2 Produktions-, Proliferations- oder Plasmazellen-Phase: Durch intensive Proliferations-, Transformations- und Reifungsvorgänge der induzierten Gewebselemente unter stetiger Zunahme der Ak-Produktion läuft der Immunprozeß seinem Höhepunkt entgegen. Besonders vermehrt ist der Anteil pyroninophiler, plasmazellulärer Elemente, deren relativ geringe Strahlensensibilität die verminderte Beeinflußbarkeit dieser Phase durch Bestrahlung verständlich macht

1.2.7 Die Deutungen dieser Befunde phasenabhängiger Radiosensibilität lassen sich nach der Rolle unterscheiden, die sie entweder dem applizierten Ag oder dem Organismus im Zustand der Sensibilisierung geben.
Durch die Bestrahlung kommt es offenbar zur Darstellung sehr strahlensensibler in den ersten Stunden nach Ag-Gabe ablaufender Reaktionsschritte, wofür die frühe Anwesenheit des Ag im Organismus entscheidend sein soll. Danach müßte das Ag mit einer gewissen Anlaufszeit das lymphoretikuläre Gewebe durch Stimul-ierung von Zellelementen größerer Strahlenresistenz aus dem Zustand relativer Strahlenempfindlichkeit vor Ag-Gabe sehr schnell in den relativer Strahlenresistenz nach einem bestimmten Zeitraum nach Ag-Gabe überführen. Funktionell wäre diese Anlaufszeit durch vorbereitende, aber bereits Ag-gesteuerte und -spezifische Vorgänge wie intravasale Ag-Clearence, Eintritt des Ag in die Ak-Bildungsstätten (16), seine Digestion und Aufschlüsselung in den Makrophagen sowie als In-

formationsübertragung zusammengefaßte Abstimmungsvorgänge der Proteinsynthese auf die Ag-Natur gekennzeichnet (17).

Alternativdeutungen betonen weniger die Spezifität und Ag-Abhängigkeit der initialen Vorgänge als vielmehr deren Anteil am Muster zellulärer Funktions- und Gestaltzustände im lymphoretikulären Gewebe zum Bestrahlungszeitpunkt(7). Für diese Betrachtungsweise ist das Ag weniger in seiner determinierenden als in seiner auslösenden Funktion bedeutsam. Hierin wäre es demnach austauschbar gegen unspezifische Agentien mit auslösender Wirkung auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge in den zuständigen Geweben. So könnten einige Grundvorgänge des Immunprozesses gleichsam unspezifisch simuliert werden. Die Berechtigung zu dieser These liefern gewisse Befunde einer proliferativen und funktionssteigernden Wirkung unspezifischer d.h. nicht selbst antigener Substanzen wie Kohle- (7), Tusche- (7), Kaolin- (7), Dextran- (7) und Zymosan-Suspensionen (7,19) auf das RHS (19) mit begleitender Verringerung der Strahlensensibilität (7). Das gleiche gilt für das lymphoretikuläre Gewebe im nicht sensibilisierten (7) und im sensibilisierten (7) Zustand. Diese Beobachtungen sind Ausgangspunkt der vorgelegten Untersuchungen mit dem unspezifischen Adiuvans Gamma-Aluminium-Hydroxid (GAH).

1.3 Die sogenannte unspezifische Stimulierung der Ak-Bildung

Neben den wahrscheinlich zahlreichen peristatischen Bedingungen, die in unspezifischer Weise Immunreaktionen allein schon unter experimentellen Bedingungen beeinflussen, sind diejenigen Faktoren, die isoliert werden konnten und von denen ein

reproduzierbarer steigernder Effekt feststellbar ist, als unspezifische Reize (20) zu bezeichnen. Die nähere Analyse ihrer als heterogen und verwickelt anzunehmenden Wirkungsweise erfordert im Falle chemischer Agentien möglichst einfache, chemisch wie physikochemisch genau definierte und von biologischen Nebenwirkungen weitgehend freie Substanzen.

Von ihnen zeigen die für die Herstellung von Impfstoff-Adsorbaten als sog. Adiuvantien benutzten Oxide und Hydroxidmodifikationen des Aluminiums (Übersicht s. 21) einen deutlichen, mithilfe der Antikörpertiter quantitativ faßbaren Stimulationseffekt auf die ausgelösten Immunvorgänge. Sie bilden mit anderen geprüften Aluminiumverbindungen wie Alaunen, Sulfaten und Phosphaten eine zwar chemisch, nicht aber physikochemisch genau definierte Gruppe anorganischer Adiuvantien. Die besonderen Schwierigkeiten bei der Analyse ihrer Wirkungsweise sind zum Teil durch den Umstand bedingt, daß sie zu den genannten Zwecken ausschließlich als Adsorbentien benutzt werden, wodurch die Kenntnis ihrer physikochemischen Eigenschaften (Partikelgröße, Adsorptionsverhältnisse, Stabilität, Löslichkeit) ein besonderes Gewicht erhält.

Für das klassische Adiuvans der organischen Gruppe, die Freund'sche Suspension in ihrer kompletten und inkompletten Form, konnte durch getrennte Applikation von Adiuvans und Ag ein lokalregionaler Effekt am Applikationsort von einem allgemeinen unspezifischen Einfluß auf die Immunitätslage des Gesamtorganismus getrennt werden (21). Daher liegt die Frage nahe, ob auch für das in der Impfstoffherstellung häufig verwendete GAH selbst durch räumlich und zeitlich vom Ag getrennte Appli-

kation ein solcher überregionaler direkter Einfluß auf die Ak-Bildungsstätten darstellbar ist. Als übergeordnetes morphologisches Substrat dieser Stimulation ist das RHS zu vermuten und somit eine Vergleichsmöglichkeit zu anderen Substanzen mit gesicherter RHS-Stimulation wie Kohlesuspensionen, Kaolin, Zymosan und Dextran gegeben.

Untersuchungen unter diesem Aspekt liegen für GAH bislang nicht vor. Die einzigen Ergebnisse nach getrennter Applikation von Adiuvans und Ag betreffen die Kinetik des Serumaluminiumspiegels bei Pferd und Rind nach protrahierter Resorption aus dem Adiuvansdepot (22). Untersuchungen über Einflüsse dieses Adiuvans auf das für die Immunreaktion des Gesamtorganismus repräsentative Organ, die Milz, sind nicht bekannt geworden. Vielmehr betreffen die meisten mit der gesamten Immunitätslage befaßten Publikationen die Kinetik der Serumtiter (21), während die morphologisch orientierten Arbeiten nur Vorgänge im Injektionsgranulom (23,24,25) und in den regionären Lymphknoten beschreiben (26,27).

Es erscheint daher sinnvoll, mithilfe einer quantitativen zytologischen Methode nach Stimulation in der Milz auftretende zelluläre Vorgänge zu erfassen und mit den serologischen Veränderungen zu vergleichen.
Damit wären in einem allgemeineren Zusammenhang Informationen über Art und Ausmaß einer Strahlenschutzwirkung dieses Adiuvans und gleichzeitig über dessen Wirkungsweise als Impfstoff-Adsorbat zu erwarten.

1.4 Fragestellung

Mithilfe der Agar-Plaque-Technik nach Jerne wird bei der ganzkörpervor- bzw. -nachbestrahlten, der unspezifisch mit GAH vorstimulierten und der kombiniert vorbehandelten Maus versucht, folgende Frage zu beantworten:

1.4.1 Läßt sich in dem durch die Plaque-Technik vorgegebenen System ein Unterschied in der Radiosensibilität gegenüber 250 R zwischen sensibilisiertem und nicht sensibilisiertem Zustand aufgrund des Verhaltens Ak-bildender Milzzellen nachweisen und quantitativ bestimmen?

1.4.2 Wie verhalten sich im gleichen immunologischen System sensibilisierte Milzzellen nach Vorbehandlung mit GAH?

1.4.3 Welchen Einfluß hat die Vorbehandlung mit GAH auf die Radiosensibilität dieses immunologischen Systems?

2. Methodik

2.1 Allgemeines

Die angewandte Methode verwendet die sogen. Agar-Plaque-Technig (9), wie sie 1963 erstmals von Jerne, Nordin und Henry angegeben wurde. Es handelt sich um ein quantitatives Verfahren zum direkten Nachweis Ak-freisetzender Zellen. Das Prinzip besteht in der Inkubation eines hämolytischen Systems aus Schaferythrozyten als Ag mit einer Suspension sensibilisierter Zellen des lymphoreticulären Gewebes unter Zusatz von Komplement in einem erstarrenden Zellzuchtmedium. Dadurch bleibt das raum-zeitliche Kontinuum zwischen Zelle und freigesetzten Ak-Mengen erhalten und in Gestalt hämolytischer Plaques der Zählung und Beobachtung zugänglich. Die im Vergleich zu den bislang gebräuchlichen direkten Nachweismethoden wie der Fluoreszenzmarkierung (27-29), Autoradiographie (31), Isolierung in Mikrotropfen oder Mikropipetten (30), der bakteriellen Adhärenz und Immobilisation (32,33), Immuncytoadhärenz (34,35) und Virusneutralisation (30) wesentlich einfachere Technik hat in jüngster Zeit zahlreiche Abwandlungen für speziellere Fragestellungen (36-43) erfahren. Eine fast gleichzeitig publizierte Technik ist eine Objektträgermethode und verwendet als erstarrendes Medium Methylzellulose (44). Man kann somit unter den direkten Verfahren zum Nachweis Ag-bildender Zellen die sogen. LHG- (lokalisierte Hämolyse in Gel) Techniken den erwähnten übrigen Techniken gegenüberstellen. Die methodischen Vorteile der LHG-Verfahren liegen

2.1.1 in der Erfassung entweder der gesamten oder einer repräsentativen Zahl Ak-bildender Zellen eines immunologisch kom-

petenten Organes. Dies ist für Untersuchungen in der Frühphase des Immunprozesses mit ihren noch geringen Mengen produktiver Zellen vor deren logarithmischer Vermehrung oder aber in anderen Situationen mit kleinem Anteil aktiver Zellen (Bestrahlung, chemische Immunsuppression, sog. natürliche Ak-Bildung) bedeutsam.

2.1.2 Einfachheit und relative Schnelligkeit vermeiden weitgehend Aktivitätsverluste der Zellen während der Versuchsdauer oder gestatten diese unter definierte Bedingungen zu bringen.

2.1.3 Beide Verfahren konnten ursprünglich nur korpuskuläre Ag testen, ermöglichen aber durch Absorption löslicher Ag (45,46) an die Oberfläche der Test-Erythrozyten oder durch Verwendung verschieden gestalteter Erythrozyten Abwandlungen, die z.B. Informationen über Verschiedenartigkeit und Zahl der von einer Zelle produzierten Ak geben könnten.

2.1.4 Die freigesetzten Ak sind durch Verlangsamung der Diffusion ins extrazelluläre Kompartiment um die Zelle angereichert und so der Isolierung und weiteren Analyse zugänglich.

2.1.5 Zusätze von Substanzen mit Einfluß auf die Zellteilung, die Proteinsynthese und andere Stoffwechselvorgänge ergeben weitere experimentelle Möglichkeiten (47).

2.1.6 Die Isolierung einzelner Zellen und ihre licht- oder elektronenoptische sowie biochemische Analyse werden möglich (48-50).

2.2 Methodische Voraussetzungen

Nach den Angaben der Literatur (51) läuft der hämolytische Immunprozeß bei der Maus im wesentlichen innerhalb der ersten 10 - 20 Tage nach Ag-Gabe ab. So beginnt bei der CBA-Maus schon am 9. Tage nach i.v.Injektion von 4 x 10^8 Schaferythrozyten die Plaquezahl stetig bis auf das Niveau natürlicher Plaquebildung zum 21. Tage parallel den Hämolysintitern im Serum abzufallen. - Mithilfe einiger in der letzten Zeit entwickelter Modifikationen (36-38) der ursprünglichen Jerne-Technik, den sog. developed-plaque-Techniken, konnte von mehreren Autoren die Existenz einer Population von Plaquezellen u.a. auch in der Mäuse-Milz nachgewiesen werden, die von dem Originalverfahren Jernes offenbar nicht erfaßt wird (36). Es handelt sich um Milzzellen, die vorwiegend oder ausschließlich Akk der mercaptoäthanolresistenten 7S-Klasse mit einer im Vergleich zu den mit der Originaltechnik erfaßten 19S-Ak 10^2-10^3-fach geringeren hämolytischen Aktivität (52,53,54) produzieren. Aus verschiedenen Angaben der Literatur geht aber hervor, daß die mercaptoäthanolempfindlichen 19S-Akk mindestens bis zum 7. - 9. Tage nach Ag-Gabe das Immungeschehen beherrschen: 7S-Ak werden mit der Coombs-Technik bei der Maus am 4. - 5. Tag nachgewiesen (37,55). Aufgrund der 2-Mercaptoäthanol-Resistenz beträgt ihr Anteil am 4. Tage 2,5 % und am 10. Tage 25 % (51). Jedoch scheinen gewisse Eigenschaften der 7S-Ak mercaptoäthanol-empfindlich zu sein (57-58); offenbar gibt es eine Klasse sensibler 7S-Lysine (55), so daß dieses Kriterium nur zusammen mit der Bestimmung der Svedberg-Einheit verwertbar ist (73). Mithilfe verschiedener Modifika-

tionen der LHG-Technik sind einerseits am 5. Tage, dem zellulären und serologischen Maximum, bei der Maus noch keine 7S-Plaques, aber nach dem Dichtegradienten hochmolekulare sensible Ak im Serum, ab 10. Tage 73 % 7S-Plaques, 27 % 19S-Plaques und im Serum 7S-Ak erfaßbar (37), während andererseits mit Anti-Gamma-Serum 7S-Plaques (sogen. developed plaques) spärlich schon am 3. und maximal am 6. Tage - also 2 Tage nach dem Maximum der 19S-Plaques (sogen. direct plaques) - zählbar sind (59). Der indirekte Fluoreszenz-Ak-Test von Wiggsel, Möller u. Anderson soll vor dem 5. - 6. Tage keine 7S-Plaques ergeben; gleichzeitig betonen die Autoren die strenge Korrelation zwischen der Plaque-Kinetik im Jerne-Test und den 19S-Ak im Serum über einen Ag-Dosisbereich von 3 Zehnerpotenzen (60). Dies gilt auch, wenn man die Mercaptoäthanol-Sensibilität der Serum-Ak heranzieht, zumindest im logarithmischen Teil der Plaque-Kurven (9). Zusammenfassend ist also festzustellen, daß wenigstens bis zum 7. - 8. Tage die durch den Jerne-Test erfaßten 19S-Ak-Plaques bei der Maus für die Erst-Reaktion typisch sind. In den folgenden Tagen treten die mit dieser Technik nicht darstellbaren 7S-Ak-Plaques zunehmend in den Vordergrund des zellulären und humoralen Geschehens. Nach diesem Zeitraum sind die Ergebnisse allein für die 19S-Fraktion zutreffend. Daß die gemessenen Hämolysintiter im Serum auch noch in den darauffolgenden Tagen mit den 19S-Plaquezahlen in Verbindung zu bringen sind, wird durch 10^2 - 10^3fach höhere hämolytische Aktivität der 19S-Ak (52-54) und die im Vergleich am 10. nur 5 - 6 mal größere Quantität der 7S-Ak (7) sowie durch den bis dahin parallelen Verlauf von Plaque- und Titerkurven wahrscheinlich gemacht.

Noch weniger bedingt dürfte die Aussage des Jerne-Testes in den Serien nach Vor- und Nachbestrahlung sein. Es läßt sich zeigen, daß 4 Wochen vor Ag-Gabe mit 550R bestrahlte Ratten, in der Frühphase der Erholung nur mercaptoäthanolsensible und damit überwiegend 19S-Ak- gegen Hammelerythrozyten bilden (61).

2.3 Material und Technik

2.3.1 Tiermaterial: Weibliche NMRI-Mäuse, Kisslegg/Allgäu. Alter 12 Wochen. Körpergewicht 20 - 23 g. 6 - 10 Tiere/Käfig. Standardisiertes Trockenpressfutter (pellets). Stalltemperatur 20 - 22° C.

2.3.2 Antigen: Hammelerythrozyten einer handelsüblichen Konserve der Behringwerke Marburg. Sensibilisierung: i.p.-Applikation von 4 x 10^8 Schaferythrozyten in 0,5 - 0,7 ml physiologischer Kochsalzlösung nach dreimaligem vorgerigen Waschen.

2.3.3 Adiuvans: Gamma-Aluminium-Hydroxid als Probe von den Behringwerken Marburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Gealterte Suspension, die in 100 g eine 10 g Al_2O_3 entsprechende Menge Tonerde-Gel enthält. I.m.-Applikation von je 0,1 ml in beide Hinterläufe am 10. und 5. Tage vor Ag-Gabe.

2.3.4 Bestrahlung: Siemens-Stabilipan-Gerät. 250R, 200kV, 20mA, HWSD 1,1 mm Cu. Dosisleistung 100R/min. Dosismessung in mittlerem Tierkörperabstand frei Luft. Bestrahlungszeitpunkt: 48^h vor bzw. nach Ag-Gabe.

2.3.5 Zellsuspension: Entnahme der Milz nach Tötung durch Dekapitation, gleichzeitig Blutentnahme zur Serum-Titerbestimmung. Schonendes Zerzupfen des Milzgewebes und Passieren durch ein Stahlnetz (100 Maschen/inch^2) sofort nach Entnahme und Überführung in eisgekühltes EBM (Eagles Basalmedium ohne Serumzusatz). Mehrfaches Aspirieren der 10 bzw. 5 ml Portionen durch eine 18er Kanüle und Durchspritzen des Netzes bis zum Verschwinden sichtbarer Partikel. Aufbewahrung bis maximal 1^h bei 4^o C bis zur Inkubation. pH 7,2 bei Zimmertemperatur.

2.3.6 Zählung kernhaltiger Zellelemente/Volumeneinheit Zellsuspension in der Bürker-Kammer. Bestimmung devitalisierter Zellen nach Schrek (62) durch Verwendung einer 1 %o-igen Eosinlösung als Verdünnungsmedium der Erythrozytenpipette. Auszählung von 3 - 5 Pipetten/Tier. Gleichzeitige Durchmusterung nach primären oder sekundären Zellaggregaten.

2.3.7 LHG- oder PFC(plaque forming cell)-Technik nach der Originalarbeit von Jerne, Nordin und Henry (9). Bei der Abweichung in einigen technischen Details konnten Erfahrungen genutzt werden, die sich bei einem Gast-Aufenthalt am Tumorbiologischen Institut der Karolinska-Hochschule (Direktor: Prof. Dr. Klein) unter Anleitung durch Herrn Doc. Dr. L. Revesz ergaben.

2.3.7.1 Das im folgenden kurz Zellagar genannte erstarrende Trägermedium zur späteren Aufnahme des immunologischen Systems wird als 0,7 %ige Lösung von Bacto- oder Nobelagar in EBM ohne Serumzusatz mit Phenolrot-

indikator auf pH 7,2 eingestellt und in Quantitäten von 2 ml in Reagenzgläsern abgefüllt und mit Wattever-schluß bis zur Verwendung (in 1 - 2 Tagen) bei 4^{o} C aufbewahrt. Zur Vermeidung einer Infektion wurde den unter sterilen Kautelen hergestellten Agarportionen 10^{5} IE Penicillin und 100 mg Streptomycin/100 ml EBM zugesetzt.

2.3.7.2 Als ein gegenüber dem Zellagar leicht hypertones Substrat wird ein 1,4 %iges im übrigen wie unter 2.3.7.1 hergestelltes Agar-Gel verwendet. Dieser Substrat-Agar wird in Quantitäten von 10 - 15 ml in Glas-Petrischalen von 180 mm Ø steril ausgegossen und nach dem Erstarren wie unter 2.3.7.1 aufbewahrt (1 - 3 Tage).

2.3.7.3 Zur Aufnahme des hämolytischen Systems Erwärmung des Zell-Agars im Wasserbad bis zum Verflüssigungspunkt bei 96^{o} C. Aufbewahrung im flüssigen Zustand bei 43^{o} C. Zuerst Einpipettieren von 0,1 ml einer 1 %igen DEAE-Lösung in EBM, Durch Zusatz dieses Di-Aethyl-Amino-Aethyl-Dextrans, dem salzsauren Salz eines basischen polymeren Polykations mit Hauptvalenz-Kette von Polyose-Struktur,kommt es wahrscheinlich zu einer Blockierung antikomplementärer Sulfonsäureradikale des Agar-Polymers durch Nebenvalenzen der parallel ausgerichteten Dextran-Molekülketten; dadurch reduziert sich die nötige Komplementmenge auf 1/10.
Als zweites werden 0,1 ml einer 30 %igen Suspension mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschener Hammelerythrozyten in EBM und als drittes 0,1 ml der

nach 2.3.5 gewonnenen Milzzellsuspension zugefügt. Dabei wird auf vorsichtiges, möglichst homogenes Durchmischen der Komponenten besonders geachtet.

2.3.7.4 Schnelles, gleichmäßiges Ausgießen des rasch erstarrenden Röhrcheninhaltes von 2,3 ml über eine zuvor auf Zimmertemperatur gebrachte Substrat-Agar-Platte. Pro Milz werden 3 - 5 Agar-Platten angelegt. Überdecken der Kultur und rasches Abstellen auf einer möglichst horizontalen Fläche bis zum völligen Erstarren innerhalb von ca. 1 Minute. Bei geschicktem Arbeiten kommt es zu einem nachweislich quantitativen Überführen des Röhrcheninhaltes und zur gleichmäßigen, geschlossenen Zell-Agar-Schicht.

2.3.7.5 Inkubation der Petrischalen für 1^h bei 37^o C im Thermostaten. Danach Überschichtung mit 1,5 ml einer Verdünnung 1 : 10 von Meerschweinchen-Komplement in EBM und nochmals Inkubation für 30' bei 37^o C.

2.3.7.6 Das Resultat sind in Abhängigkeit vom Tag nach Ag-Gabe mehr oder minder zahlreiche statistisch über die Zell-Agar-Oberfläche disseminierte Hämolysepunkte ("Plaques"). Das osmotische Gefälle zwischen Zell- und Substrat-Agar führt zu einer Wanderung der flüssigen Phase aus dem Zell-Agar-Gel in den Substrat-Agar, wodurch es einmal zu einem festeren Haften der noch kurz nach Inkubationsende leicht ablösbaren und zerstörbaren Zell-Agar-Schicht und zum anderen zu einer verstärkten Diffusion freigesetzten Hämoglobins aus den zunehmend aufklarenden Hämolysepunkten kommt. Nach Anfärbung mit

Benzidin treten die Plaques besonders im Durchlicht deutlich mehr oder minder scharfrandig hervor.

2.3.7.7 Pro Milz wurden 3 - 5 Platten von 3 - 5 Tieren pro Tag mit einer sechsfachen Lupe ausgezählt.

2.3.7.8 Hämolysintiterbestimmungen von 3 - 5 Tieren/Tag nach der Methode von Taliaferro. 1 E/ml = reziproker Wert derjenigen Serumverdünnung, die mindestens 50 % Lysis aufweist.

2.3.7.9 Bei der statistischen Analyse der Ergebnisse wurde durch Varianz-Analyse geprüft, ob Unterschiede zwischen den verschieden behandelten Serien bestehen. Die Mittelwerte der Plaque-Maxima wurden mit dem t-Test auf die Signifikanz ihrer Unterschiede geprüft.
Die Berechnungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Schneider, Direktor des Institutes für Biometrie der Med. Hochschule Hannover durchgeführt.

3. Ergebnisse

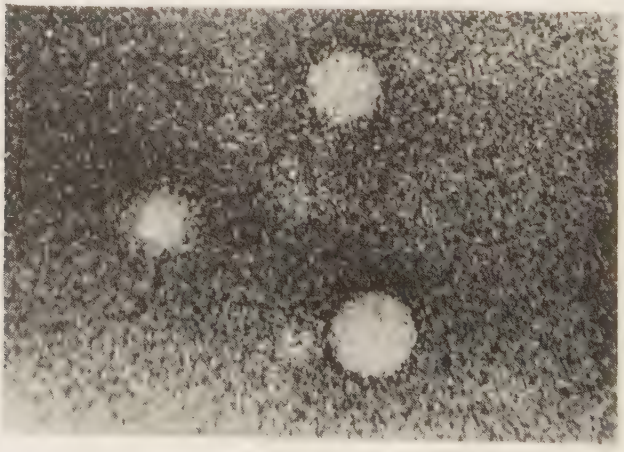
3.1 Untersuchungen zur Methode

3.1.1 Die "normale" oder "natürliche" Plaquesbildung:
Unter den angegebenen Bedingungen ist eine Plaquebildung schon an Milzen nicht experimentell sensibilisierter Tiere in geringerem Ausmaß nachweisbar. Die mittlere Häufigkeit dieser als normal zu bezeichnenden Plaques betrug 200 $\pm$ 40 /Milz. Daraus errechnet sich ein Anteil von ca. $0{,}8 \times 10^{-3}$ ‰ zur nicht experimentell induzierten Hämolysinbildung befähigter Milzzellen. Morphologisch waren dies Plaquesbildungen echt im Sinne der nachfolgend geschilderten, an experimentell induzierten Plaques erhobenen Kriterien. Auch mikroskopisch war ihr Aufbau von diesen nicht zu unterscheiden. Ihre Bildung ist ebenfalls komplementabhängig, da Inkubation mit einem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung an Stelle von Komplement nicht zu Plaquesbildungen führt. Die Temperaturabhängigkeit geht aus der fehlenden Plaquesbildung nach 24-stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur hervor.

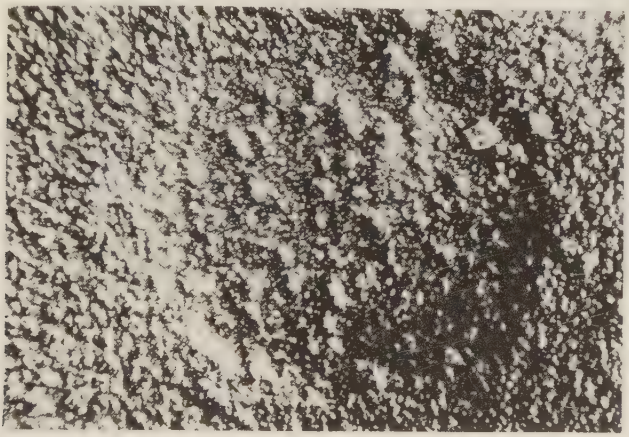
3.1.2 Die experimentell induzierte Plaquesbildung:
Am 4. bis 6. Tage nach Ag-Gabe treten auf den Agar-Platten dichte Populationen stochastisch über die Oberfläche verteilter Plaques auf, deren Auftreten ebenfalls an die Anwesenheit von Komplement und an eine Inkubationstemperatur über 35° C gebunden ist. Ihre Bildung ist in soweit spezifisch, als gegen Hammelerythrozyten sensibilisierte Systeme gegen Human- bzw. Hammelerythrozyten als Indikator-Ag keine Plaquesbildungen zeigten.

3.1.3 Plaquesstruktur, Artefakte:
Form und Struktur der Plaquesbildungen wurde an dichteren Populationen von ca. 300 - 600 Plaques/Platte am 3. - 4. Tage nach Ag-Gabe makroskopisch, lupenoptisch und mikroskopisch untersucht (s. Abb. 1).

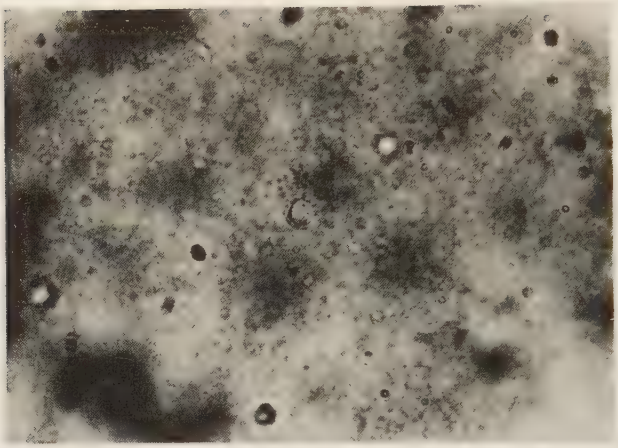
Makroskopisch stellen sich nach möglichst restlosem Abgießen des Komplementüberstandes ca. 0,3 - 1,2 mm große kreisrunde, wechselnd klare und scharf begrenzte Transparenzen innerhalb der trübroten Zell-Agar-Schicht dar (s. Abb. 2).



Bereits beim Antrocknen der Agar-Oberfläche sind diese Punkte bzw. Scheibchen im Schräglicht als schüsselförmige Einsenkungen zu erkennen (s. Abb. 3).



Die Lupenbetrachtung zahlreicher benzidingefärbter Transversalstufen zeigt unterhalb der Eindellung ein Aufhellungs-Sphäroid unterlagert von angefärbten Diffusionsfiguren freigesetzten Hämoglobins in der Substrat-Agar-Schicht. Mikroskopisch findet sich im Zentrum der Plaques eine ca. 10 - 11 µ große überwiegend mononukleäre Zelle sehr unterschiedlicher Gestalt. Der vorwiegend zentral gelegene Kern ist von einem wechselnd breiten Zytoplasmasaum umgeben. Unter den gelegentlich mit zentral gelegenem Kern versehenen Zellen wurde vereinzelt Zweikernigkeit festgestellt. In zwei Fällen konnten Teilungsvorgänge (Telophasen) gesehen werden. Die exakte zytometrische Definition ist wegen der starken Diffraktion des einschließenden Agars auch phasenoptisch nicht gelungen (s. Abb. 4). Innerhalb der Aufhellungen liegen in Abhängig-



keit vom Verdünnungsgrad der Milzsuspension in mehr oder minder großen Abständen rund- oder polymorphkernige Zellen verstreut. Vollständige Hämolyse wird durch ein gleichmäßig dichtes Muster aus Erythrozytenschatten angezeigt; die makroskopische Randschärfe der Plaques wird durch den wechselnd breiten Saum der peripheren Mischpopulation aus Erythrozyten unterschiedlichen Lysegrades bestimmt. Vereinzelte Plaques boten zwischen Zentrum und Rand das Bild partieller Hämolyse mit Mischpopulationen aus etwa gleich vielen Erythrozyten und Erythrozytenschatten. Umgekehrt waren auffälligerweise in Plaques mit vollständig lysierten Erythrozyten ganz vereinzelt völlig intakte Erythrozyten zu sehen. Auch bei mikroskopischer Durchmusterung zahlreicher Agar-Platten konnte die Möglichkeit der Bildung kleinster, der Lupenzählung sich entziehender Plaques nicht bestätigt werden. - Artefakte: Verwechslungsmöglichkeiten mit nach Größe und Aufhellungseffekt plaquesähnlichen Artefakten wurden an Agar-Platten mit nicht sensibilisierten Systemen geprüft. Die vereinzelt zu beobach-

tenden plaquesähnlichen Phänomene sind nach einiger Übung schon makroskopisch auf Luftblasen, Agar-Schollen, hämolytisch wirksame Staubpartikel und Komplementkoagula nach Benzidinfärbung zurückzuführen. Für die sehr seltenen Zweifelsfälle konnte durch kurze Lufttrocknung der Agar-Oberfläche und anschließende Betrachtung im Schräglicht die entscheidende makroskopische Sicherheit gewonnen werden: Es ließen sich leichte Erhabenheiten über kreisrunden Luftblasen, polygonalen Agar-Schollen oder fädigen Komplementkoagula von deutlichen schüsselförmigen Einsenkungen über mikroskopisch als echt erwiesenen Plaquesbildungen zweifelsfrei unterscheiden. Änderungen der Plaquesgestalt konnten während des beobachteten Zeitraums nach Ag-Gabe nicht gesichert werden, es bestand lediglich der Eindruck einer größeren Streuung der Plaquesdurchmesser von bestrahlten Milzen.

3.1.4 Plaquesentwicklung: Ca. 20 min. nach Überschichtung mit Komplement treten die ersten Plaques auf; Schärfe und Kontrast nehmen bis zur 25. - 30. Minute zu, danach sind keine weiteren Veränderungen zu beobachten. Ebenso ist nach dieser Zeit die Plaqueszahl konstant.

3.1.5 Isolierungsgrad der Gewebselemente: Voraussetzung für die Gleichung Plaqueszahl = Plaqueszellzahl ist die vollständige Trennung aller Milzzellen aus ihrem geweblichen Zusammenhang bis zum Versuchsende. Sie wurde direkt mikroskopisch und indirekt aus der umgekehrten Proportionalität von fallender Plaqueszahl zu steigenden Verdünnungsstufen der Milzsuspension erschlossen.

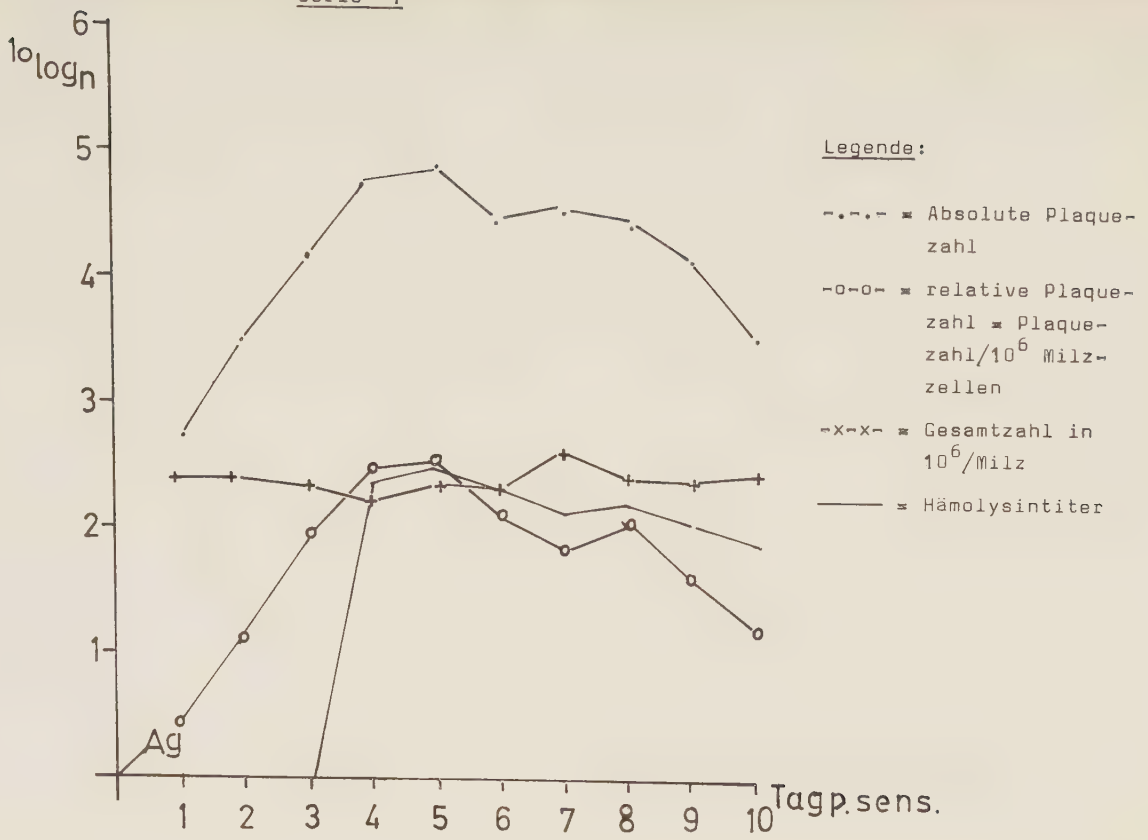
3.1.6 Der Schädigungsgrad der Milzzellen wurde im Vitalitätstest nach Schrek mit 1 %o Eosinlösung innerhalb des Zeitraums zwischen Suspensionierung und Inkubationsbeginn ermittelt. Danach waren in allen Serien 70 - 80 % der Zellen ungefärbt, d.h. lebensfähig.

3.2 Plaque- und Titerkinetik nach Ag-Gabe (s. Kurve 1)

Die zellulären Veränderungen in Milzen sensibilisierter Mäuse innerhalb der ersten 10 Tage nach Ag-Gabe werden durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl, der absoluten und der relativen Plaquezahl erfaßt. In der sog. absoluten Plaquezahl wird das gesamte während der Inkubationsdauer zur Hämolysinfreisetzung befähigte Zellpotential der Milz ausgedrückt. Die sog. relative Plaquezahl stellt die Fraktion hämolysinbildender Zellen in einem Standardkompartiment von 10^6 Organzellen dar. Damit ist eine Vergleichsbasis für die in ihrem Gesamtzellgehalt und damit der Plaquezellzahl individuell stark unterschiedlichen Milzen gegeben.
Diesen drei zellulären Parametern werden die Veränderungen im Serum durch Bestimmung der Hämolysintiter gegenübergestellt.

Vom 1. - 10. Tage nach Ag-Gabe beschreiben sowohl die absoluten wie auch die relativen Plaquezahlen als auch die Serumtiter in semilogarithmischer Darstellungsweise einen biphasischen Kurventyp, bestehend aus einer ersten Phase mit einem Gipfel am 5. Tage, der zugleich das Maximum des gesamten Reaktionsverlaufs darstellt, und einer zweiten Phase mit einem Gipfel am 7. - 8. Tage.

Serie 1



Legende:

-.-.- = Absolute Plaquezahl

-o-o- = relative Plaquezahl = Plaquezahl/10^6 Milzzellen

-x-x- = Gesamtzahl in 10^6/Milz

——— = Hämolysintiter

Die Berechnung der täglichen Zunahmefaktoren innerhalb des logarithmischen Anstiegs der ersten Phase erlaubt näherungsweise eine kinetische Betrachtung der Plaquesbildung. Ausgehend von einem Normalwert von 200 $\pm$ 40 hat sich 24 Stunden nach Ag-Gabe die Anzahl plaquesbildender Milzzellen mehr als verdoppelt (Faktor 2,3). Während des 2. Tages ist die Zunahme um den Faktor 7,0 am intensivsten. Danach verlangsamt sich der Prozeß zunehmend bis zu seinem Höhepunkt am 5. Tage, am stärksten in den letzten 24 Stunden vor dem Maximum. Die entsprechenden Faktoren sinken von 5,7 über 3,6 auf 1,3 ab. Der Höchstwert von 82000 Plaques/Milz ist am 5. Tage erreicht. Damit hat sich der Anteil induzierter Milzzellen am Gesamtorgan innerhalb von 4 Tagen von 1,9 x 10^{-3} ‰ am 1. Tage auf 0,37 ‰ am 5. Tage erhöht. Daraus errechnet sich eine Steigerung um das 180-fache. Nach dem Maximum kommt es zu einem schnellen Absinken der absoluten Plaqueszahlen zwischen dem 5. und 6. Tag. Anschließend wird die erste Phase durch eine zweite Phase vorübergehender Wiederaufnahme der Plaquesbildung mit einem Gipfel am 7. - 8. Tage von 30000 Plaqueszellen/Milz abgelöst. Diese zweite Phase hat in den letzten 24 Stunden vor ihrem Höhepunkt eine Plaquesbildungsgeschwindigkeit, die derjenigen der ersten Phase zu diesem Zeitpunkt vergleichbar ist (Faktor 1,23 bzw. 1,26). Danach ist bis zum 10. Tage ein deutliches Abklingen der Reaktion zu verfolgen.

Die relativen Plaqueszahlen folgen ohne zeitliche Verschiebung gegenüber den absoluten Werten der gleichen biphasischen Kinetik. Deshalb liegt das Maximum von 272 Plaques/10^6 Milzzellen ebenfalls am 5. Tage. Daraus errechnet sich eine Zunahme seit dem 1. Tage um das 200-fache.

Die graphische Analyse des logarithmischen Anstiegs der ersten Phase ergibt für beide Plaquesparameter keinen Hinweis dafür, daß das untersuchte System innerhalb dieses Zeitraums einen exponentiellen Vorgang approximiert.

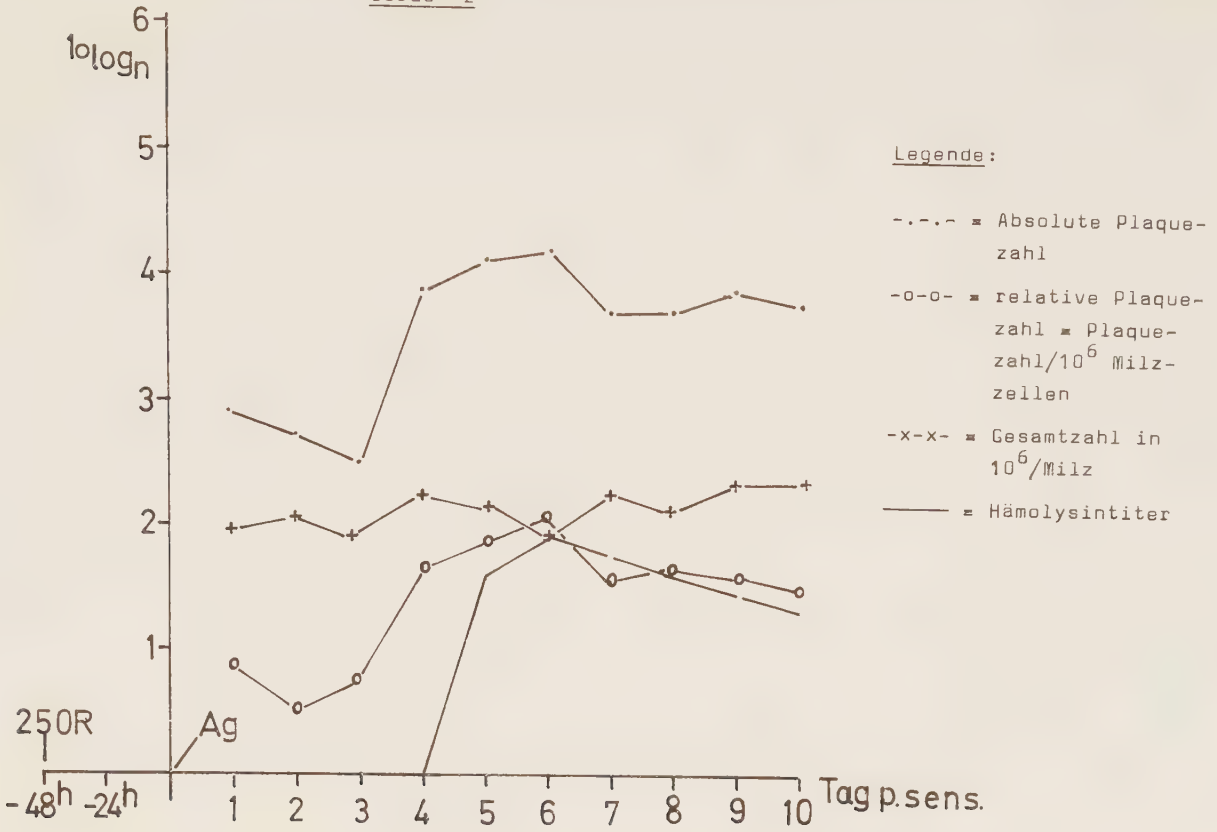
Die Serumhämolysine übersteigen erst drei Tage nach Aufnahme der Plaqueszellproduktion die untere Grenze der Nachweisbarkeit. Innerhalb von 24 Stunden wird ein - verglichen mit dem folgenden Maximum - relativ hoher Anfangstiter von 240 E erreicht. Einen Tag später ist das Maximum mit 320 E erreicht. Wie die beiden zellulären Parameter so beschreibt auch der Serumtiter einen biphasischen Kurventyp ebenfalls mit einem Gipfel am 5. und am 8. Tage, so daß sich eine deutliche Parallelität der serologischen mit den histologischen Veränderungen abzeichnet.

Im Gegensatz zu den deutlichen Schwankungen der individuellen Gesamtzellzahlen, die am 2. Tage z.B. um den Faktor 6 verschieden sind, verhalten sich die arithmetischen Tagesmittel vom 1. - 10. Tage etwas einheitlicher; ihre Extreme liegen nur um den Faktor 2,8 auseinander.

3.3 Plaque- und Titerkinetik nach Vorbestrahlung (s. Kurve 2)

Nach Bestrahlung mit 250 R 48 Stunden vor Ag-Gabe erreicht die absolute Plaqueszahl in den ersten 24 Stunden einen den Kontrollen vergleichbaren Wert. Danach fällt die Plaqueszahl deutlich bis zum 3. Tage ab; die bereits erreichten Plaquesmengen des 1. Tages werden auf 23 % reduziert. Zu diesem Zeitpunkt

Serie 2



Legende:

-.-.- = Absolute Plaquezahl

-o-o- = relative Plaquezahl = Plaquezahl/10^6 Milzzellen

-x-x- = Gesamtzahl in 10^6/Milz

——— = Hämolysintiter

werden nur 18 % der Plaquesmengen nicht bestrahlter Milzen gebildet. Der aus den Kontrollen bekannte logarithmische Anstieg ist um 2 Tage verzögert und hat den extrem hohen Zuwachsfaktor (Steilheit) von 28. Trotz dieser starken Beschleunigung der Kinetik ist der Wert des 4. Tages um 87 % unter dem der Kontrollen. Wie bei unbestrahlten Tieren verlangsamt sich der Vorgang nach dem 4. Tage bis zu dem auf den 6. Tag verzögerten Maximum. Die entsprechenden Faktoren 1,2 und 1,7 sind nur gering von dem Wert 1,3 der Kontrollen verschieden. Der Einfluß auf das Maximum ist an seiner Verzögerung um 24 Stunden und der Senkung seines Wertes auf 20 % der Vergleichsserie ablesbar. Der Anteil induzierter Elemente am Milzgewebe ist auf dem Höhepunkt mit 0,108 ‰ nur etwa ein Drittel unbestrahlter Tiere. Insgesamt hat sich vom 1. - 6. Tage der Plaque-Zellgehalt der Milz um das 198fache und damit wenig stärker geändert als bei den Kontrollen (180fach). Der Plaque-Schwund nach dem Maximum von 70 %/24 Stunden ist von dem der Kontrollen nicht nennenswert verschieden. Der depressive Effekt der Vorbestrahlung ist anhand der Wertegruppe aus Maximum, vorausgehendem und folgendem Tag statistisch gesichert ($p<0{,}01$). Die 2. Phase zeigt gegenüber dem Vorbestrahlungsinsult das gleiche Verhalten wie die erste Phase: Verringerung der Plaquezahlen auf 28 % der Kontrollen, Verzögerung um 24 Stunden und einen Zuwachsfaktor von 1,47 (Vergleichswert 1,7) vor dem Maximum.

Die relativen Plaquewerte folgen ohne Verzögerung den gleichen Veränderungen wie die absoluten. Das zum 6. Tage verzögerte Maximum ist auf 29 % der Vergleichswerte ebenso signifikant reduziert wie die Wertegruppe aus dem 5., 6. und 7. Tag.

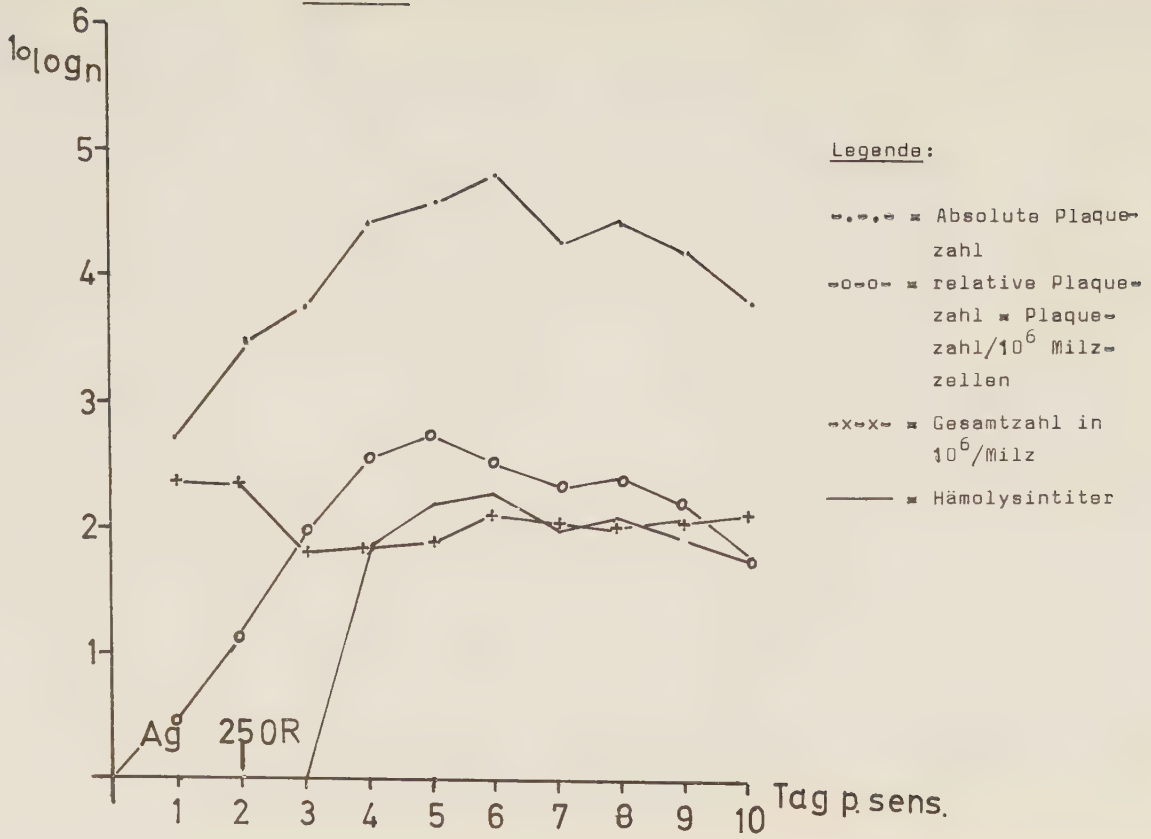
Die Serum-Hämolysine treten erst 24 Stunden später als in der Vergleichsserie auf. Ihr Anfangswert ist mit 16 % der Kontrollen erheblich vermindert. Die Verzögerung und Depression betrifft auch das Maximum, das in Übereinstimmung mit den absoluten und relativen Plaquewerten erst am 6. Tage und nur zu 25 % erreicht wird.

Der mittlere Zellgehalt der Milz ist während der Produktionsphase (1. - 6. Tag) auf 1,26 x 10^8 Zellen/Organ verglichen mit unbestrahlten Tieren (2,28 x 10^5) auf fast die Hälfte vermindert.

3.4 Plaque- und Titerkinetik bei Nachbestrahlung (s. Kurve 3)

Ganzkörperbestrahlung mit 250 R, der die Ag-Gabe 48 Stunden vorausging, verringert 24 Stunden später die absolute Plaqueszahl auf 35 % der Kontrollen. In den folgenden Tagen gleichen sich die Werte denen unbestrahlter Tiere zunehmend an. Jedoch ist das Maximum um 24 Stunden zum 6. Tage verzögert, die Senkung seines Wertes um 24 % aber nicht signifikant. Der Organanteil spezifisch induzierter Zellen liegt mit 0,39 ‰ zu diesem Zeitpunkt in der Größenordnung der Kontrollen (0,37 ‰) und deutlich über dem Wert nach Vorbestrahlung (0,108 ‰). Die Anzahl plaquebildender Milzzellen hat sich vom 1. - 6. Tage um den Faktor 138 und damit weniger excessiv als nach Vorbestrahlung (198) und bei den Kontrollen (180) vermehrt.
Die rein formale Betrachtung der Kurve mithilfe der täglichen Zuwachsfaktoren liefert näherungsweise eine zeitliche Einordnungsmöglichkeit der Manifestation des Strahleninsultes und

Serie 3



Legende:

-.-.- = Absolute Plaque-zahl

-o-o- = relative Plaque-zahl = Plaque-zahl/10^6 Milz-zellen

-x-x- = Gesamtzahl in 10^6/Milz

——— = Hämolysintiter

eine Erklärung für die verhältnismäßig geringgradige Beeinflussung der Reaktion auf ihrem Höhepunkt. Es zeigt sich danach eine deutliche Verlangsamung der Plaques-Kinetik lediglich vom 2. bis zum 3. Tage, wo der Zunahmefaktor 2 deutlich unter dem Wert 5,7 der Kontrollen liegt. In den folgenden Tagen ist ein Einfluß der Bestrahlung auf die Plaquesbildungsgeschwindigkeit nicht festzustellen. Damit wäre der im Vergleich zur Vorbestrahlung beschriebene geringe Effekt der Nachbestrahlung auf das Maximum einer vorübergehenden Verzögerung der Plaquesbildung zwischen dem 2. und 3. Tage zuzuschreiben; danach wird dieser Strahlenschaden offenbar in Richtung auf normales Verhalten soweit kompensiert, daß seine Folgen für den Höhepunkt der Reaktion auf ein statistisch gegenüber den Kontrollen nicht mehr zu sicherndes Maß verringert sind.

Bei der 2. Phase wird der Gipfelwert unter Nachbestrahlung wie das Maximum um 24 Stunden verzögert, aber mit größerer Geschwindigkeit (Faktor 1,63 gegen 1,36) und unter geringerer Senkung des Wertes (10 % gegen 24 %) erreicht. Auch die 2. Phase ist offenbar gegenüber der Nachbestrahlung resistenter als gegenüber Vorbestrahlung.

Dagegen sind die relativen Plaqueszahlen bis zum 3. Tage gegenüber den Vergleichswerten nicht erniedrigt, danach sogar in zunehmendem Maße erhöht. Das Maximum liegt unverändert am 5. Tage, die Erhöhung seines Wertes gegenüber dem unbestrahlter Tiere ist jedoch nicht signifikant, dagegen ist dies im Vergleich zu den vorbestrahlten Tieren der Fall. Die Erhöhung der relativen Plaqueszahl prägt sich in den folgenden Tagen

noch stärker aus und hält bis zum 10. Tage an. Zu ihrer Deutung ist die Senkung der Gesamtzellzahl im Rahmen der allgemeinen Zellverminderung durch Bestrahlung heranzuziehen. So ist am 4. und 5. Tage der Zellgehalt des Organs auf 40 % und am 6. Tage noch auf 70 % des Ausgangswertes reduziert.

Auch die Serumtiterwerte bringen die gegenüber der Vorbestrahlung deutlich geringere Wirkung der Nachbestrahlung zum Ausdruck. Ohne Verzögerung werden am 4. Tage gegenüber 16 % bei Vorbestrahlung schon 33 % des Titerwertes der Kontrollen gebildet. Das Maximum ist vergleichbar mit den absoluten Plaqueswerten (24 %) um 36 % reduziert und um 24 Stunden verzögert. Dem gegenüber beträgt die Depression des Maximums nach Vorbestrahlung 87 %.

Zwischen dem Bestrahlungszeitpunkt am 2. Tage nach Ag-Gabe und dem Höhepunkt der Plaquesbildung am 6. Tage ist der mittlere Zellgehalt der Milz von $9,5 \times 10^7$ Zellen gegenüber dem Wert nicht bestrahlter Tiere von $2,5 \times 10^8$ Zellen vermindert. Jedoch ist wegen der erwähnten starken Schwankungsbreite der Gesamtzellzahlen verschiedener Tiere dieser Unterschied statistisch nicht zu sichern

3.5 Plaques- und Titerkinetik nach unspezifischer Vorstimulierung (s. Kurve 4)

Wie den vorstehenden Ergebnissen zu entnehmen ist, führt lediglich die Vorbestrahlung unter den gewählten Bedingungen zu einer statistisch gegenüber den Kontrollen gesicherten

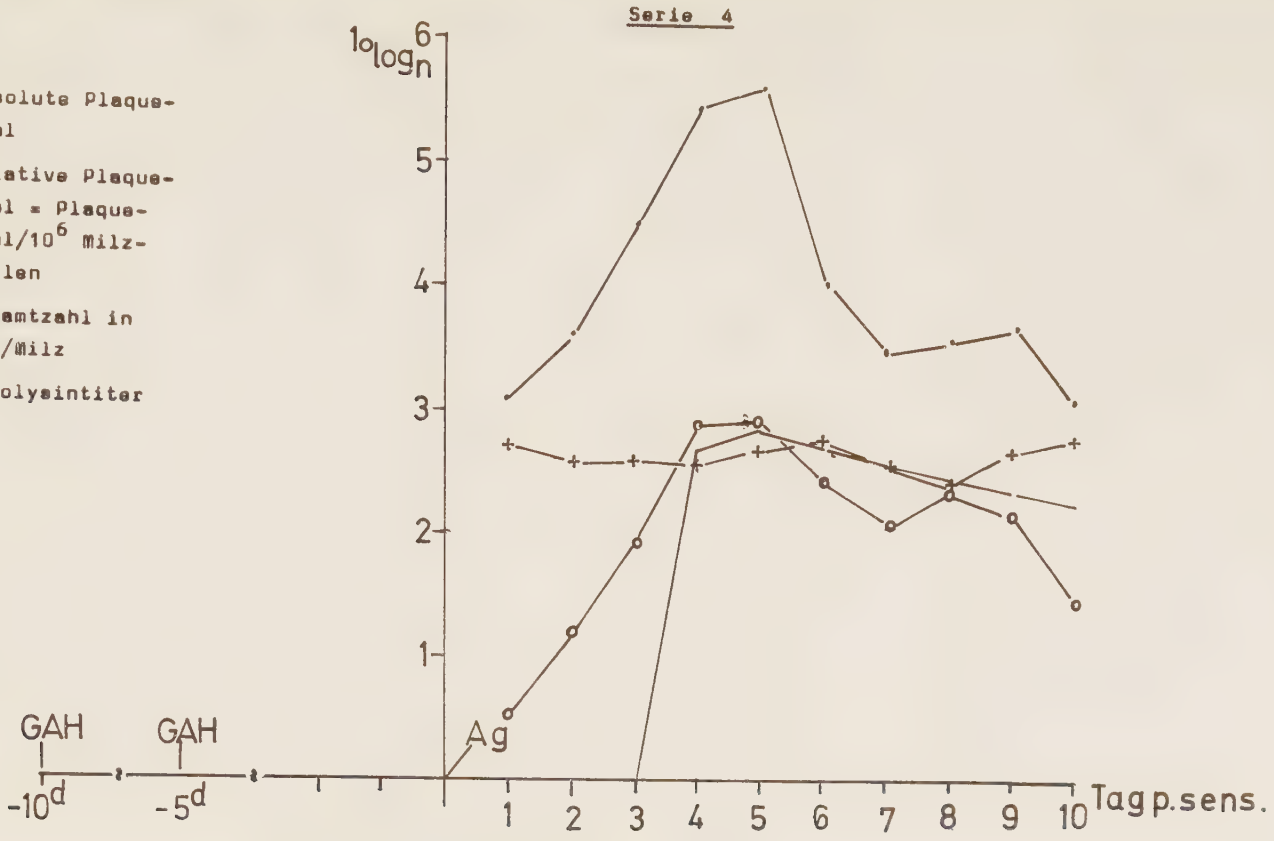
Legende:

-.-.- = Absolute Plaquezahl

-o-o- = relative Plaquezahl = Plaquezahl/10^6 Milzzellen

-x-x- = Gesamtzahl in 10^6/Milz

——— = Hämolysintiter



Schädigung der Immunreaktion. Daher wird die Möglichkeit einer unspezifischen Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit des Immunprozesses am Modell des Vorbestrahlungsschadens in zwei weiteren Serien untersucht.

Die unspezifisch stimulierende Wirkung des GAH wurde in einer 1. Serie mit Tieren getestet, denen das Material in der unter 2.1.3 angegebenen Weise appliziert wurde.

Sowohl die absoluten als auch die relativen Plaqueszahlen sind nach dem 3. Tage nach Ag-Gabe ausnahmslos und zum Teil in beträchtlichem Maße erhöht; sie folgen dem biphasischen Verlaufstyp der Kontrollen. Absolute und relative Maxima liegen unverändert am 5. Tage, ihre Werte sind auf 220 % bzw. 77 % signifikant erhöht. Zu diesem Zeitpunkt sind etwa 0,66 ‰ der Milzzellen induziert, die Zunahme vom 1. - 5. Tag excessiver als in allen übrigen Serien (300fach). Ebenfalls signifikant höher sind die entsprechenden Werte 24 Stunden vor und nach dem Maximum. Auch an den Werten der 2. Phase ist für beide Parameter ein stimulatorischer Effekt ablesbar. Die absoluten Werte haben am 8. und 9. Tage einen zweiten Höhepunkt, der noch um 70 % über den Kontrollen liegt.

Sucht man anhand einer Betrachtung der täglichen Zuwachsfaktoren die Manifestation der stimulatorischen Wirkung zeitlich einzuordnen, so ergibt sich folgendes: während die Kinetik vom 1. zum 2. Tage sogar langsamer (Faktor 3,8 gegen 7,0) als in den Kontrollen ist, tritt in den folgenden Tagen eine zunehmende Beschleunigung der Plaquesbildung mit den Faktoren 6,7 und 7,9 bis zum 4. Tage ein. Im gleichen Zeitraum zeigt die Kinetik nicht stimulierter Tiere nach ihrem Höhepunkt am 2. Tage mit den Faktoren 5,7 und 3,5 deutlich abfallende Tendenz.

Der logarithmische Anstieg der 1. Phase läuft nach dem 4. Tage bis zum Maximum mit der in allen Serien ungefähr gleichen Geschwindigkeit (Faktor 1,38) aus. Daraus ist zu folgern, daß sich der stimulatorische Einfluß auf die Plaquesbildungsgeschwindigkeit nicht unmittelbar nach Ag-Gabe, sondern erst nach einer gewissen Anlaufszeit kurz vor dem Maximum zeigt.
Noch deutlicher ist dies an den relativen Plaqueszahlen zu zeigen: 24 Stunden vor dem Maximum sind bereits 97 % des höchsten Plaqueswertes erreicht, so daß sich eine gewisse Vorverlegung des Höhepunktes der Reaktion andeutet. Vergleicht man den Einfluß auf die absoluten Plaqueswerte der 1. Phase mit dem auf die 2. Phase, so ist an der 2. Phase eine Verzögerung um 48 Stunden und eine deutlich geringere Anhebung ihres Gipfelwertes um nur 68 % gegen 220 % beim Maximum auffällig.

Im Serum treten Anfangstiter und Maximum nicht eher als bei unbehandelten Tieren auf, dagegen sind ihre Werte auch hier wie in den Bestrahlungsserien in Übereinstimmung mit den Zelliveränderungen beeinflußt, und zwar im Sinne einer Steigerung um je 200 %. Noch am 7. und am 10. Tage liegen die Titer deutlich über den Vergleichswerten.

Die mittleren Organzellzahlen sind während der Proliferationsphase gegenüber denen nicht stimulierter Tiere auf $4{,}42 \times 10^8$ Zellen/Organ um fast das Doppelte erhöht.

3.6 Plaque- und Titerkinetik nach kombinierter Vorbehandlung (s. Kurve 5)

Der Einfluß der Vorstimulierung auf die Strahlensensibilität des hämolytischen Immunprozesses wurde in der folgenden Serie untersucht. Der Vorbestrahlung mit 250 R 48 Stunden vor Ag-Gabe gingen am 10. und am 5. Tage die nach 2.1.3 ausgeführten Injektionen von GAH voraus.

In den ersten 24 Stunden nach Ag-Gabe bildet die Milz noch Plaqueszahlen in der Größenordnung eines nur stimulierten Systems, danach bis zum Versuchsende ausnahmslos wesentlich geringere Mengen. Der logarithmische Anstieg der Plaqueskurve ist wie nach Vorbestrahlung um 2 Tage verzögert, ohne daß es jedoch zu einem Absinken der Plaqueszahlen kommt. Die entsprechenden Zuwachsfaktoren 1,2 am 2. Tage und 1,4 am 3. Tage liegen deutlich unter den Vergleichswerten 3,8 bzw. 6,1 nach Vorstimulation und 7,0 bzw. 5,7 bei den Kontrolltieren. Vom 3. Tage ab nähert sich das Verhalten mit den Faktoren 6,1 vom 3. zum 4. und 2,9 vom 4. zum 5. Tage dem unbehandelter Tiere mit den Werten 6,0 bzw. 3,6. Da der Prozeß in den letzten 24 Stunden vor dem Höhepunkt mit der gleichen Geschwindigkeit ausläuft wie in allen übrigen Serien (1,03), dürfte die Verzögerung des Maximums auf den 6. Tag und die hoch signifikante Senkung auf 15,3 % des Vergleichswertes vorstimulierter Tiere im Wesentlichen einer sich am 2. und 3. Tage manifestierenden Verlangsamung der Plaque-Kinetik zuzuschreiben sein. Nach diesem Zeitpunkt wird die Bildungsgeschwindigkeit offenbar so weit normalisiert, daß am 5., 6. und 7. Tage signifikant mehr Plaqueszellen in der Milz erscheinen als nach Vorbestrah-

Serie 5

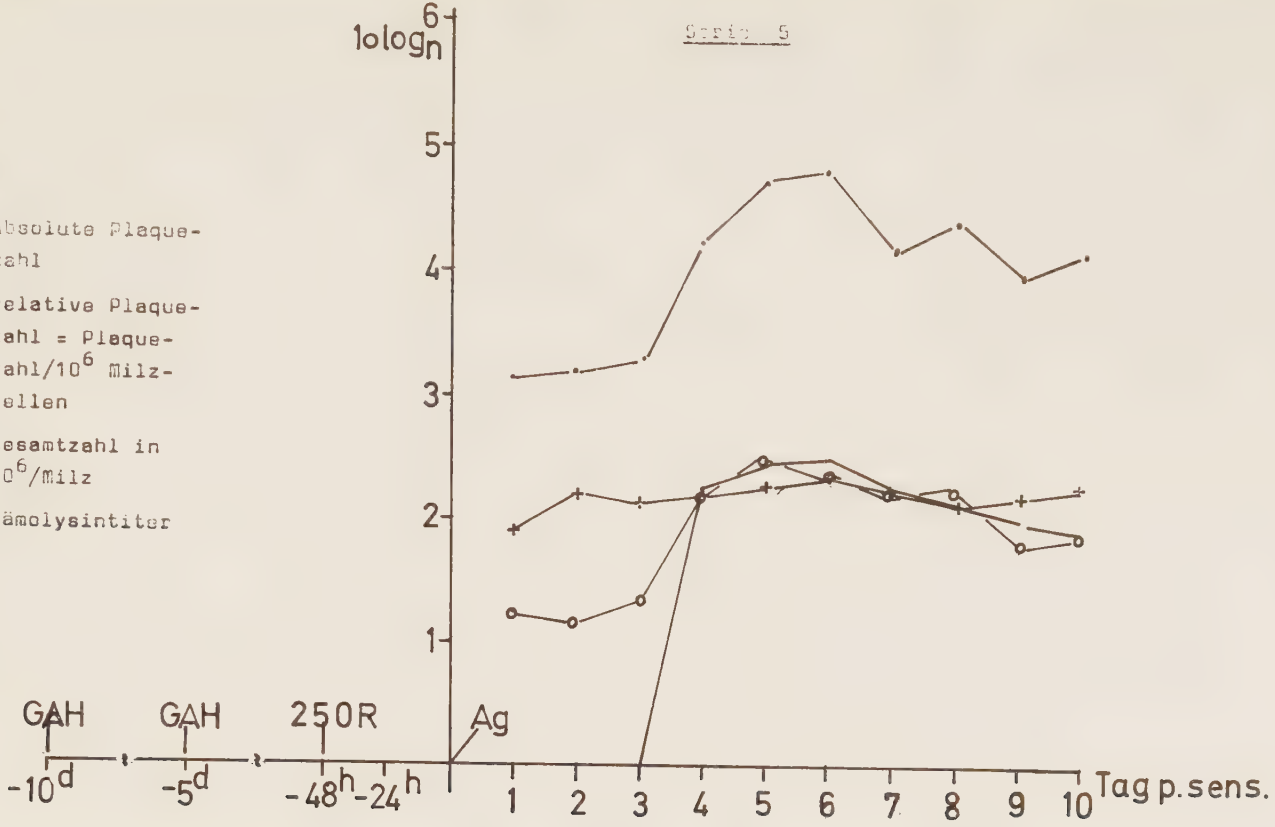
Legende:

-.-.- = Absolute Plaque-zahl

-o-o- = relative Plaque-zahl = Plaque-zahl/10^6 Milz-zellen

-x-x- = Gesamtzahl in 10^6/Milz

——— = Hämolysintiter



lung, aber signifikant weniger als nach Vorstimulierung. Demnach ist der Manifestationszeitpunkt des Vorbestrahlungsinsultes bei der kombinierten Behandlungsweise für den 1. - 3. Tag - entsprechend dem Verhalten nach Vorbestrahlung - und des Vorstimulierungseffektes für den 3. - 4. Tag - entsprechend dem Verhalten nach Vorstimulierung - zu vermuten. Vom 1. - 6. Tag hat sich die gesamte Plaqueszellzahl nur um den Faktor 30 - das ist der geringste Wert aller Serien - geändert. Die folgenden Werte bis zum 10. Tage sind denen der Kontrollen vergleichbar. Ihr biphasischer Verlaufstyp ist mit einem Maximum am 5. und einem Gipfel am 8. Tage unverändert erkennbar.

Die relativen Plaqueszahlen unterliegen auch in dieser Serie prinzipiell den gleichen Veränderungen wie die absoluten. 24 Stunden nach Ag-Gabe ist die Fraktion über 5mal größer als nach Vorstimulierung. Zu diesem Zeitpunkt sind die absoluten Werte beider Serien etwa gleich groß, die Erhöhung der relativen Werte ist daher auf den geringeren Zellgehalt der Milz kurz nach der Strahleneinwirkung zurückzuführen. Die im Vergleich zur Bildung der Plaqueszellen in den darauf folgenden Tagen vorübergehend stärkere Zunahme der Gesamtzellzahl läßt schon am 2. Tage die relative Plaqueszahl absinken, sogar geringgradig unter das am 1. Tag erreichte Niveau. Danach erhöht sich aber der Anteil plaquesbildender Zellen zunehmend bis zu einem Maximum, das am 5. Tage erreicht ist. Zu diesem Zeitpunkt ist die relative Plaqueszahl mit 34 % des Wertes nur stimulierter Tiere signifikant verringert und gegenüber den Werten vorbestrahlter Tiere am 4., 5. und 6. Tag signifikant höher. Wie bei den absoluten Plaqueswerten so ist auch bei den relativen auf dem Höhepunkt der Reaktion (4., 5. und 6. Tag)

die statistische Trennung von denjenigen vorstimulierter sowie vorbestrahlter Tiere möglich, jedoch nicht gegenüber den Kontrollen. In der gewählten Dosierung sind also Vorstimulierung und Vorbestrahlung einander insofern äquivalent, als die Immunreaktion nach kombinierter Vorbehandlung im wesentlichen derjenigen unbehandelter Tiere entspricht.

Die Serumhämolysine haben wie in allen übrigen Serien den gleichen Entwicklungsgang wie der Gehalt der Milz an Plaqueszellen. Die äquivalente Dosierung von Vorbestrahlung und Vorstimulierung zeigt sich auch serologisch in dem angenäherten Verlauf der Titerkurve mit derjenigen der Kontrollen. Der Einfluß der Bestrahlung auf die Titerkinetik entsteht, wie allen Serien zu entnehmen ist, über eine quantitative Beeinflussung der absoluten Plaqueszahlen in der Milz.

Die mittlere Gesamtzellzahl in der Milz liegt während des Versuchszeitraums um den Faktor 3 unter derjenigen nach Stimulation und um den Faktor 2 unter der unbehandelter Tiere. Dagegen ist gegenüber den Werten nach Vorbestrahlung ($1{,}52 \times 10^8$) kein nennenswerter Unterschied ($1{,}43 \times 10^8$) festzustellen. Demnach vermag die unspezifische Vorstimulierung die Reduzierung der Gesamtzellzahl im Verlaufe des Immunprozesses nach Vorbestrahlung im Gegensatz zur Anzahl spezifisch induzierter Zellelemente nicht nennenswert gegenüber den Kontrollen zu beeinflussen.

4. Diskussion

4.0 Mithilfe der "Agar-Plaque-Technik" nach Jerne ist die Existenz hämolysinfreisetzender Zellen vom 19S-Typ nachzuweisen und quantitativ zu erfassen. Bei Inkubationstemperaturen unter 20° C und über 43,5° C waren Plaquesbildungen nicht zu beobachten. Der Anteil der bei dem gewählten mechanischen Vorgehen zur Herstellung der Milzzell-Suspension devitalisierten Zellen betrug im Schrek-Test 20 - 30 % und entspricht den Angaben der Literatur (47,59). Der Zerteilungsgrad der Zellen in der Suspension bis in Einzelelemente ist indirekt aus der umgekehrten Proportionalität von Plaqueszahl und Verdünnungsstufe und direkt aus mikroskopischen Prüfungen bei der Zellzahlbestimmung zu sichern. Danach ist es berechtigt, aus der absoluten Plaqueszahl unter Berücksichtigung des Prozentsatzes devitalisierter Zellen und der Voraussetzung gleicher mechanischer Vulnerabilität aller Gewebselemente direkt auf die Zahl plaquesbildender Zellen in der Milz zu schließen.

Die sporadisch auftretenden, morphologisch Plaquesbildungen ähnlichen Artefakte, verursacht durch unspezifisch hämolytisch wirksame Staubpartikel und Komplementkoagula nach Anfärbung der Platten mit Benzidin, Luftblasen und Inhomogenitäten des Zellagars konnten durch das einfache Merkmal der schüsselförmigen Oberflächeneindellung (s. Abb. 3) echter Plaquesbildungen unter Schrägbeleuchtung sicher ausgeschieden werden.

Die freigesetzten Hämolysine sind insoweit spezifisch als sie gegen Testerythrozyten von Ratte und Mensch inaktiv sind.

4.1 Die "natürliche Plaquesbildung"

Bereits unter Normalbedingungen, d.h. ohne vorhergehende Sensibilisierung mit Schaferythrozyten, ist in den Milzen von NMRI-Mäusen eine Fraktion von 200 ± 40 Milzzellen nachzuweisen, welche gegen Schaferythrozyten gerichtete Hämolysine freisetzen. Dieser Wert ordnet sich den in der Literatur veröffentlichten Zahlen gut ein: 12 - $16/10^8$ Milzzellen (63), $60/10^8$ (Milzzellen (37), $2/10^6$ Milzzellen (65), 10 - 100/Milz (51). Die Werte genügen einer von Tierstamm und Alter abhängigen Normalverteilung (63). Übereinstimmend mit unseren mikroskopischen Beobachtungen bewegen sich die Durchmesser natürlicher und induzierter Plaques in den selben Grenzen (63). Natürliche Plaques entstehen vorwiegend in der Milz, weniger in den peripheren Lymphknoten (63), die von ihnen produzierten Ak gehören der 19S-Klasse an (63). Nach Versuchen mit gnotobiotischen Ferkeln sind für das Vorkommen dieser natürlichen Plaques Gemeinsamkeiten der antigenen Determinanten von Schaferythrozyten und mikrobiellen Agg der Darmflora verantwortlich (64). Untersuchungen über das Verteilungsmuster dieser Zellen im lymphoretikulären System der Maus weisen allerdings in den Mesenteriallymphknoten und Peyrschen Plaques wesentlich weniger Plaquezellen nach als etwa in den regionären Lymphknoten des Stammes (63). Es ist daher anzunehmen, daß äußere, die natürliche Abwehrschranke der Haut penetrierende Gelegenheitsnoxen mit Ag-Gemeinschaften zu Schaferythrozyten von größerer Bedeutung sind.

4.2 Die sporadisch zu beobachtenden nicht lysierten und mikroskopisch völlig intakten Erythrozyten in Plaques aus

vollständig lysierten Schaferythrozyten entstammen wahrscheinlich dem Blutgehalt der suspensionierten Milz. Da sie von Schaferythrozyten nicht zu differenzieren sind, ist die Möglichkeit der Existenz einer in ihrer Antigenität abweichenden Fraktion der Schaferythrozyten nicht auszuschließen.

4.3 Plaquestruktur und Plaquezellen

Unter den strukturellen Eigentümlichkeiten der Plaques fallen besonders die starken Größendifferenzen innerhalb der Plattenpopulationen und die deutlichen Unterschiede in der Randschärfe und im Aufhellungsgrad auf. Dies gilt für sämtliche Serien (Abb 2). Es besteht der Eindruck, daß die genannten Streuungen in bestrahlten Milzen eher noch größer sind. Zur Deutung dieser Phänomene wären ausführlichere mikro- und photometrische Verteilungsstudien notwendig; entsprechende Angaben fehlen in der Literatur. Deshalb kann auch zu der Möglichkeit eines verschiedenen Ak-Gehaltes der Einzelzelle nicht entscheidend Stellung genommen werden. Angaben über die lytische Effektivität der anscheinend kontinuierlich freigesetzten Ak schwanken zwischen 1 - 2 19S-Molekül/Schaferythrozyt (Kaninchen) (52,53) und 10^5 - 10^7 19S-Molekülen/10^2 - 10^3 Schaferythrozyten (9). Da zur Synthese in vitro der für die Bildung einer Plaque notwendigen Ak-Menge ca. 1^h und für die Plaquelysis 50' (47) erforderlich sind, ist die Frage zu stellen, inwieweit hier nicht der funktionelle Ausdruck für die besonders hinsichtlich des Endoplasmatischen Reticulums so unterschiedliche Ultrastruktur der untersuchten Plaquezellen (50) zu finden ist.

Die jeweils im geometrischen Plaque-Zentrum eindeutig zu lokalisierenden Zellen sind 9 - 11u (15 untersuchte Zellen) groß, überwiegend mononukleär mit einem großen, zentralen Kern umgeben von einem unterschiedlich schmalen Cytoplasma-Saum. Schon diese groben morphologischen Angaben erwecken den Eindruck einer gestaltlichen Uneinheitlichkeit der Plaquezellen, so daß keine Berechtigung besteht, im morphologischen Sinne von "der" Plaque-Zelle zu sprechen. Der lichtmikroskopischen Definition stehen als Schwierigkeiten neben der mechanischen Deformierung während des Aufbereitungsverfahrens und der nativen sphärischen Gestalt im Agar auch die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Agarmediums entgegen. So verhindert beispielsweise die starke Diffraktion des Lichtes im leicht opaken Agar die genaue phasenoptische Untersuchung des Nativpräparates und die chemischen Eigenschaften erschweren die färberische Darstellung der Zellen mit konventionellen Methoden (Giemsa). Mit einer speziellen Abwandlung der Jerne-Technik (84, 85), die es gestattet, Agarschichten von der Dicke eines Zelldurchmessers herzustellen, gelang die Anfärbung der Plaque-Zellen nach Giemsa. Die wenigen präparierten natürlichen Plaquezellen sind kleine Elemente mit einem durchschnittlichen Durchmesser unter 11u, meist basophiler als kleine Lymphozyten und einem den größten Teil der Projektionsfläche einer Zelle einnehmenden Kern. Diese Gruppe enthielt außerdem 1 Plasmazelle und eine im Gegensatz zu allen restlichen Elementen mit dem applizierten Tritium-Thymidin markierte Zelle vom Typ des kleinen Lymphozyten. Die experimentell induzierten Plaquezellen des 2. - 4. Tages lagerten als Zeichen intensiver DNA-Synthese Thymidin

ein und waren zwischen 10 und 21u groß (65). Bei der Bewertung der Zelldurchmesser im Vergleich zu unseren Messungen am Nativpräparat ist eine gewisse Applanation der Zellen in der äußerst dünnen Agarschicht in den zitierten Untersuchungen zu berücksichtigen. Die für die wesentliche Eigenschaft dieser Zellen, der intensiven Proteinsynthese, bestimmenden morphologischen Substrate sind Ultrastrukturen wie endoplasmatisches Retikulum und Ribo- bzw. Polysomen und damit Domäne elektronenoptischer Verfahren. Daher sind die wenigen mit der Morphologie dieser Zellen befaßten Publikationen (48-50,66,67) überwiegend elektronenoptischer Art. So finden sich am 4. Tage nach Ag-Gabe in Poplitäallymphknoten des Kaninchens zwei morphologisch unterschiedliche Gruppen von Plaqueszellen. Sie entsprechen in ihren extremen Ausprägungen den lichtoptischen Typen der Plasmazelle bzw. dem Lymphozyten. Genauere Angaben über ihre zahlenmäßige Relation sind wegen der geringen Anzahl der mit einigem technischem Aufwand zu präparierenden Plaqueszellen vorerst nicht möglich. In der Lymphozytengruppe mit Zellgrößen von 5-7u treten morphologische Eigenschaften teils von kleinen Lymphozyten, teils von Lymphoblasten auf; endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien sind spärlicher in den kleineren, reichlicher in den größeren Lymphozyten ausgebildet. Dieser verhältnismäßig einheitlich strukturierten Gruppe steht die andere mit Zellgrößen von 7 - 9u gegenüber. Ihr lichtoptisches Äquivalent sind Plasmazellen verschiedener Reifungsgrade und mit diesen zunehmend stark ausgebildetem endoplasmatischen Retikulum (50). Gewisse Beobachtungen (68-71) sprechen dafür, daß zwischen beiden Gruppen Transformationen bestehen und sie beide letztlich die Extreme zu einer von den Lymphozyten zu den Plasmazellen reichenden

Folge zunehmender funktioneller Reifung bilden. Es wird mit dem Test offenbar nur eine gewisse Gruppe morphologisch uneinheitlicher Zellen in einer kurzen Phase funktioneller Übereinstimmung erfaßt. Die beobachteten sporadischen Telophase-Figuren sind offensichtlich den 2,6 % innerhalb von 4 - 5 Stunden sich teilender und dabei unverändert antikörperfreisetzender Zellen (72) zuzuordnen. Da diese zur Wanderung unter lebhaften amöboiden Bewegungen fähig (72) sind, ist eine Erklärung für die vereinzelt beobachteten blastomerenartig eingeschnürten Plaques mit dicht beieinander in den beiden Diffusionszentren liegenden Zellen gegeben.

Für die Erklärung der Variationsbreite der Plaquedurchmesser im makroskopischen Bereich sind aber nicht nur zytologische, sondern auch zeitliche Ursachen heranzuziehen. So ist es möglich, daß der in vivo zu verschiedenen Zeitpunkten unterbrochene und in vitro fortgesetzte Vorgang der Ak-Freisetzung zu unterschiedlich großen Plaquedurchmessern führt. Daraus würde folgen, daß auch mit der Existenz von verschieden großen Plaques im lupenoptisch-mikroskopischen Bereich zu rechnen ist. Tatsächlich können mit der Technik der "freien Suspension" (10^2 statt 10^5 - 10^7 Schaferythrozyten/Plaquevolumen) auf dem Höhepunkt der Reaktion und früher etwa 3 mal mehr Plaquebildungen gezählt werden (39). Daher sind Angaben über den absoluten Gehalt des untersuchten Organes unter Berücksichtigung der verwendeten Technik (i.e. der Erythrozytenschichtdicke) zu machen. Die Aussagekraft der hier benutzten Technik wird dadurch aber nicht berührt, da die Schichtdicke offenbar von solcher Dimension ist, daß Plaquegrößen des stark subjektiv bestimmten makroskopisch-lupenoptischen

Grenzbereiches entweder garnicht oder in zu vernachlässigendem Ausmaß vorkommen.

4.4 Plaque- und Titerkinetik nach Ag-Gabe (Serie 1, s. 3.2)

24 Stunden nach i.p.-Injektion von 4 x 10^8 Hammelerythrozyten sind die 19S(M)-Ak-bildenden Milzzellen bei der NMRI-Maus mehr als verdoppelt. Die entsprechende zytologische Latenzzeit (lag-Phase) ist demnach kleiner als 24^h und ordnet sich gut den publizierten Werten (51,60,73,74) von 1 Tag, 24 - 32^h, 18 - 24^h, 15 - 24^h, 14 - 32^h (51,73) ein. Kürzere Latenzzeiten lassen sich mithilfe einer Technik der Spezifischen Adhärenz Ag-beladener Betonit-Partikel an Hammel-Erythrozyten bestimmen. Danach sind Werte von 6 - 8^h für die Kapsel-Polysaccharid Agg Vi und SSS-I von Salmonella enteritidis beim Kaninchen zutreffend (43). Zellkulturen mit Peritonäalexsudat-Zellen der Maus reagieren auf primäre in vitro-Stimulierung mit intaktem Virus bzw. dessen Untereinheiten eines bestimmten Influenza-Stammes 10 - 20' nach Ag-Gabe mit der Bildung eines sogen. Ak-analogen Produktes (75). Damit ist zwar grundsätzlich die Fähigkeit induzierter Zellen zur Aufnahme der Ak-Synthese innerhalb sehr kurzer Zeit nach Ag-Gabe wahrscheinlich gemacht, doch ist gegenwärtig nicht auszuschließen, daß so verschieden strukturierten Agg wie Virus-Untereinheiten und Hammelerythrozyten unabhängig von der Methodik verschiedene Latenzzeiten haben.

Am 2. Tage ist der Anstieg der Plaque-Zahlen am steilsten (Faktor 7). Danach verlangsamt sich der Prozeß zunehmend bis zu seinem Stillstand am 5. Tage. Ergebnissen nach i.v.-Injek-

tion der gleichen Ag-Dosis bei der CBA-Maus ist für den 2. Tag ebenfalls die schnellste Kinetik zu entnehmen (51). Die Frage nach den grundlegenden zytokinetischen Mechanismen des logarithmischen Plaque-Zahlanstieges ist gegenwärtig Anlaß zahlreicher Untersuchungen mit den verschiedensten Methoden; dabei hat sich wiederum die Verwendung der LHC-Techniken mit ihren speziellen Modifikationen z.T. unter Wiederaufnahme älterer Fragestellungen als wesentlicher Fortschritt erwiesen.

Die zu diskutierenden formalen Möglichkeiten sind an die Voraussetzung kleinster, zu vernachlässigender natürlicher Plaque-Zahlen oder zumindest einer fehlenden Beteiligung dieser 19S-Ak-Bildner am Immunprozeß gebunden (73). Vergleicht man die etwa um den Faktor 30 schwankenden Literaturangaben über die "background-Zahlen" mit den zeitlich und numerisch sehr viel einheitlicheren (Faktor 1,5 - 3) Werten des Maximums und berücksichtigt man das Fehlen irgendeiner natürlichen Plaquebildung bei gnotobiotisch aufgezogenen Tieren (64), so ist eine peristatisch ausgelöste Entstehungsweise dieser Plaques wahrscheinlich. Dazu kommt ihr in der fehlenden Hemmung durch übertragene Anti-Schaferythrozyten-Ak von den induzierten 19S-Plaques auffällig abweichendes Verhalten (63). Nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnisse ist daher die Prämisse anzunehmen, so daß sich folgende zytokinetischen Prozesse als formal möglich (73) anbieten: a) intensive Proliferation der anfänglich nachweisbaren, wenigen Plaque-Zellen, b) Proliferation und Differenzierung (Reifung, Transformation) bislang noch unbekannter Precursor-Zellen, c) ausschließliche Differenzierung einer wesentlich größeren Zell-

population und d) irgendeine Kombination von a) - c). Möglichkeit a) ergibt unter der Voraussetzung morphologisch und funktionell streng äqualer Teilungen einen exponentiellen Bildungsvorgang, der von mehreren Autoren für den logarithmischen Kurventeil bestätigt werden konnte (9,76). Auf der Annahme solcher exponentieller Vorgänge basieren die Formeln zur Berechnung der "Generationszeiten". Die graphische Analyse unserer Kurven ergibt dagegen keinen Hinweis dafür, daß sie einen exponentiellen Vorgang approximieren. Für eine wesentliche Bedeutung der Proliferation spricht die Mehrzahl der hiermit befaßten Untersuchungen (69,73,74,77,78), wobei aber das quantitative Ausmaß und die Möglichkeit weiterer Mechanismen unbekannt sind. Zwar entsprechen die nach den vorgelegten Kurven berechneten Plaquezahl-Verdoppelungszeiten des 1. - 4. Tages von 11^h (absolute und relative Plaquezahlen) den Angaben von 6 - 12^h der Literatur (60), doch streuen die Werte für die einzelnen Tage (8,05 am 2. Tage - 14,2 am 4. Tage) stärker als bei Annahme eines rein proliferativen Generationsvorganges zu erwarten ist.

Bei der Bewertung der verschiedenen Literaturangaben über Verdoppelungszeiten - der Ausdruck Generationszeiten sollte wegen der noch ungeklärten Grundvorgänge vorerst vermieden werden - ist zu berücksichtigen, daß Hinweise für eine Ag-Dosis- und Tierstamm-Abhängigkeit der Werte existieren (60). Diesen Untersuchungen zufolge, haben die verwendeten 5 Tierstämme (Maus) bei i.v.-Injektion von 4×10^8 Schaferythrozyten Werte zwischen 4,3 und 6,4 Stunden. Dabei fällt auf, daß beim gleichen Mäusestamm Werte in der von uns angegebenen Größenordnung auftreten und der Zeitpunkt des Maximums vom

4. zum 5. Tage rückt, wenn nur eine Zehnerpotenz weniger Erythrozyten-Ag gegeben wird. Daraus ist die Möglichkeit zu entnehmen, daß langsamere Kinetik unserer Kurven - vielleicht auch die Streuungen der Tagenseinzelwerte - der protrahierten Ag-Resorption nach i.p.-Injektion zuzuordnen ist. Faßt man die für eine wesentliche Rolle der Proliferation sprechenden Ergebnisse zusammen, so stellt sich die Kinetik als eine ca. 24^h nach Ag-Gabe von ca. $32 - 10^3$ ag-sensitiven Precursorzellen der Milz ausgehender Proliferation aus 4 - 7 Zellteilungen dar (79). Transformationen ohne Proliferationen sollten nicht vorkommen (73). Das morphologische Substrat dieser Vorgänge (80) sind bei der Ratte 24^h nach i.v.-Injektion von abgetöteten B_4-E.coli-Bakterien einsetzende Migrationen von Lymphozyten bzw. primitiven Reticulumzellen aus den Randzonen der Milz-Lymphfollikel in ihr Inneres. Diese Plasmazell-Präcursoren teilen sich und wandern nach anschliessender Differenzierung zu Hämocytoblasten wieder durch die Randzone in die Rote Milzpulpa. Hier differenzieren sie sich zu reifen Plasmazellen. Sowohl die Proliferation als auch die beiden Differenzierungsschritte erfolgen in engem Kontakt mit Makrophagen (8). Dieser Darstellung stehen autoradiographische Untersuchungen an 19S-Plaques entgegen (81). Danach stimuliert das Ag eine präexistente Population sensitiver Zellen nur zu morphologischer und funktioneller Differenzierung (Ak-Synthese), ohne die Teilungsrate über die Werte der normalen (d.h. vor Ag-Gabe) Gewebsmauserung anzuheben.

Diesen Ergebnissen zufolge wird die 19S-Zelle des Jerne-Tests durch das Ag lediglich zu einer spezifischen Leistung, der 19S-Ak-Synthese, ohne vermehrte DNA-Synthese oder Proliferation

induziert. Das wäre ein zur Induktion der Enzymsynthese der Bakterien (82,83) paralleles Verhalten. Kontinuierliche Beobachtung der Plaquezellen im Jerne-Test (72) zeigt, daß etwa 5 % der Plaques 2-zellig sind und 2 - 3 % aller Plaquezellen sich innerhalb von 4 - 5^{h} teilen. Ak-Synthese und -freisetzung werden nach dem strukturellen Umbau der Zelle unter der Mitose fortgesetzt. Zwar bleibt die Mehrzahl der Tochterzellen in Kontakt miteinander, doch können sich offenbar einzelne voneinander trennen und sich unter lebhaften amöboiden Bewegungen und Ak-Liberation in verschiedene Richtungen entfernen (72). Damit finden die von uns beobachteten sporadischen hantelförmig-Blastomerenartigen Plaques mit je einer Zelle in den beiden Dissusionszentren eine Erklärung. Die nach morphologisch-histochemischen Untersuchungen (80) anzunehmenden weiträumigen intrasplenischen Migrationen der Präcursoren sind bei der Diskussion der nur scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse eines clonartig aggregierten (88) bzw. eines singulären Vorkommens der Ak-Bildner (29) ebenfalls zu berücksichtigen. Unter der Voraussetzung, daß es sich bei den amöboiden Bewegungen, ungleichem Wachstum der Tochterzellen, quadripolaren Teilungen zweikerniger Zellen, Fusionen von Tochterzellen etc. während der kontinuierlichen Plaquebeobachtung (72) nicht um Zeichen unphysiologischer Bedingungen handelt, sind die Ergebnisse mit den zitierten elektronenoptischen Studien an Plaquezellen (50) vereinbar. Danach ist es möglich, daß die 2 - 3 % mitotisch aktiver Plaquezellen der lymphocytoiden, weniger ausgereiften Gruppe angehören, während die Mehrzahl der mitotisch inaktiven Plaquezellen der anderen Gruppe plasmacytoider Gestalt entspricht. Genauere Angaben über die Mor-

phologie in den Plaquestudien und über das zahlenmäßige Verhältnis der beiden elektronenmikroskopischen Kategorien wären zu einem zwingenden Vergleich notwendig. Die Fähigkeit einer Plaquezellfraktion noch unbekannter Größe und Typisierung zur Aufnahme der Ak-Synthese nach Induktion ohne begleitende Proliferation (81) ist auch Ergebnissen zu entnehmen, bei denen eine immunologische Informationsübertragung mit RNA aus sensibilisierten Milzen auf nicht-sensibilisierte gelang (86,88,89). Eine weitere Möglichkeit nichtproliferativer Plaquezahlvermehrung während der logarithmischen Phase deuten Beobachtungen über gelegentliche stimulatorische Wirkungen auf die Plaquezahlen von geringen 19S-Ak-Mengen, die zusammen mit den antigenen Erythrozyten injiziert wurden (54), an. Vorausgesetzt, daß Beobachtungen an ganzkörperbestrahlten Ratten mit abgedeckter Milz auf das Verhalten unbestrahlter Tiere übertragbar sind, ist die Migration von Ak-Bildnern am 2. - 3. Tage nach Ag-Gabe (90) als weiterer nicht exponentieller Vorgang zu berücksichtigen. Diese großen pyroninophlien und kleinen "dunklen" Elemente wandern am zahlreichsten auf dem Höhepunkt der Reaktion (4. Tag), während die Milz das Bild einer starken Hyperplasie ihrer roten Pulpa zeigt, besonders in die peripheren Lymphknoten. Dadurch hätte die in unseren Untersuchungen abfallende Tendenz der Plaquebildungsraten in der Milz nach dem 2. Tage eine Erklärung gefunden. Da zu diesem Zeitpunkt in den peripheren Lymphknoten mithilfe der nach dem Coombs-Prinzip modifizierten Jerne-Technik keine 19S-Bildner nachweisbar sind (90), haben die beschriebenen Zellelemente diese funktionelle Phase möglicherweise während der Rezirkulation schon durchschritten. Plaquebildner im Blut

sind nach dem 4. Tage in zunehmendem Maße nachweisbar (91).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß gegenwärtig über die dem logarithmischen Plaque-Erscheinungsprozeß in der Milz zugrundeliegenden Mechanismen ein abschließendes Urteil nicht zu gewinnen ist. Es ist möglich, daß die morphologisch uneinheitlichen Plaquezellen (50,65) unterschiedlichen zytokinetischen Vorgängen entstammen, bevor sie in die funktionelle Phase der Plaquebildungsfähigkeit eintreten.

Die Plaquebildungsgeschwindigkeit in den letzten 24^h vor dem Maximum am 5. Tage hat den Faktor 1,2 - 1,3. Diese Größe bewegt sich in allen Serien innerhalb eines auffällig engen Bereiches von 1,03 - 1,7. Dagegen liegen die entsprechenden Werte aller übrigen Tage zwischen den Extremen 1,16 am 2. Tage der kombiniert vorbehandelten Serie und 28 am 4. Tage der Vor-Vorbestrahlungsserie. Daraus ist auf das weitgehende Überwiegen eines mehr oder minder einheitlichen zytokinetischen Prozesses kurz vor dem Höhepunkt der Reaktion zu schließen. Ob in diesem Zeitraum Abwanderungen von Milzzellen ins Blut im Rahmen eines übergeordneten homöostatischen Prinzips vorherrschen, läßt sich gegenwärtig nicht entscheiden. Jedenfalls sind reichlich Plaquebildner im Blut (60,91) und Abwanderungen von Milzzellen der Lymphozyten- und Plasmazellengruppe nachgewiesen (90,92-94). Die einheitliche Bildungsrate wäre danach einem eingestellten Ungleichgewicht zwischen Bildung (Proliferation, Transformation) und Abwanderung zuzuschreiben.

Das Maximum der zellulären und serologischen Entwicklung ist am 5. Tage übereinstimmend erreicht. Dieser Zeitpunkt ist

für die Plaquezahlen bei i.v.-Applikation bis 4 x 10^5, bei i.p.-Applikation bis 4 x 10^7 Schaferythrozyten indirekt dosisproportional, darüber dosisinvariant (59); daneben besteht eine Abhängigkeit vom Inzuchtstamm (60). Der Maximalwert ist ebenfalls tierstammvariant (92) und innerhalb eines tierstammabhängigen Dosisbereiches dosisvariant (59). Die Applikationsart (i.v. oder i.p.) hat bei der CBA-Maus zwischen 4 x 10^7 - 10^9 Erythrozyten keinen Einfluß (59), intradermale Injektion dagegen verzögert im Vergleich zu i.v.-Injektionen das Maximum um 24^h und läßt die meisten Plaque-Bildner in den regionären Lymphknoten 24^h früher erscheinen (93).

Der dem Maximum folgende rapide Abfall der Plaquezahlen von ca. 70 %/24^h geht aus allen publizierten Kurven hervor. Dieses "cut off"-Phänomen (95) ist offenbar auf einen Rückkopplungsmechanismus zwischen den einen Höhepunkt erreichenden 19S-Ak und den in steigender Menge produzierten 7A-Ak zurückzuführen, dieser Ak-Klasse kommt dadurch eine gewisse Kontrollfunktion im Rahmen der immunologischen Homöostase-Mechanismen zu (51,58,60,94). Morphologische Studien (96) betonen ein direktes Abwandern großer pyroninophiler Elemente aus der Milz ins periphere Blut. Das Verhalten tritium-markierter Milzzellen zu diesem Zeitpunkt (90) spricht dafür. Daneben wird eine Metamorphose der 19S-Bildner unter Reduktion ihres Zytoplasmas durch Ak-Produktion zu dichtkernigen, "dunklen" Elementen mit anschließendem Eintritt in das periphere Blut diskutiert (96).

Am 7. - 8. Tage erreicht die Plaquebildung mit der gleichen Geschwindigkeit wie in den letzten 24^h vor dem Maximum einen

2. Gipfel, der etwa 30 - 40 % der maximalen Plaquezahl ausmacht. Er ist aufgrund der eingangs gegebenen Ableitung der 19S-Fraktion zuzuordnen. In den Kurven der Literatur ist diese zweite Phase wesentlich weniger einheitlich als Gipfel ausgeprägt wie die erste Phase. Das Phänomen einer biphasischen Kinetik der Plaque-Zellen wurde zuerst bei Untersuchungen mit der modifizierten Jerne-Technik gegen das nicht-korpuskuläre Polysaccharid-Ag von E. coli beschrieben (97). Bei der CBA-Maus liegt dieser 2. Gipfel nach i.v.-Injektion von ebenfalls 4 x 10^8 Erythrozyten am 9. Tage und erreicht nur etwa 10 % des Maximums (51). Mit den nach dem Coombs-Prinzip der Anti-Globulin-Titration modifizierten LHG-Techniken (59) wird bei der CBA-Maus nach i.p.-Injektion im Dosisbereich von 4 x 10^4 - 10^9 Erythrozyten nur bei der höchsten, nach i.v.-Injektion von 4 x 10^2 - 10^9 nur in der niedrigsten Dosierung eine biphasische Kinetik der 19S-Plaques mit einem 2. Gipfel von 10 % am 9. Tage nachgewiesen. Die Kinetik der 7S-Plaques dagegen ist bei i.v.-Injektion nach sämtlichen Dosen 2 - 3-phasig, bei i.p.-Injektion nur nach den unteren und mittleren Dosen biphasisch (59). Intradermale Injektion von 2 x 10^8 Schaferythrozyten (93) bewirkt bei der Schweizer Albinomaus nur in der 1. und 2. drainierenden Lymphknotenstation eine deutliche Mehrgipfligkeit der 19S-Kurven, nicht dagegen in der Milz. Dabei fällt auf, daß die Zahl weiterer Höhepunkte nach dem Maximum von 3 in der 1. Station auf 0 in der letzten (Milz) abfällt. Die Gipfel der 7S-Kurve koinzidieren mit denen der 19S-Kurve nach dem Maximum. Nach i.v.-Injektion ist im Gegensatz zur CBA-Maus (51,59) in der Milz nur eine monophasische Kurve erkennbar, dagegen ist die 7S-Kurve auch hier mehrphasisch.

Nach autoradiographischen Untersuchungen (90,99-101) ist 2 Tage nach dem Hyperplasiemaximum in der roten Milzpulpa die Zahl markierter Ak-Bildner stark abgefallen, dagegen ein weiterer Anstieg markierter Lymphozyten als Präcursoren zu beobachten. Während des 2. Gipfels erreichen die 7S-Ak ihren Höchstwert, danach steigt bis zum 12. Tage nur ihr relativer Anteil auf 30 % (51).

Die Deutungsmöglichkeiten dieser Befunde sind nach der Bewertung der Eigenschaften des Ag und der Reaktionsmöglichkeiten des Organismus zu ordnen. Handelt es sich um verschiedene Ag-Determinanten mit unterschiedlichen Reaktionszeiten (59), so wäre zu begründen, weshalb so unterschiedlich strukturierte Ag wie Polysaccharid-Verbindungen von Bakterien und Schaferythrozyten den gleichen biphasischen 19S-Reaktiontyp auslösen. Werden dagegen verschiedene Zellclone angenommen (51), so müßten es bei der 19S-Reaktion mindestens 2, bei der 7S-Reaktion wahrscheinlich mehr Zellreihen unterschiedlicher Kinetik sein. Außerdem besteht die Möglichkeit einer schubweisen Ag-Freisetzung aus speichernden Makrophagen (97,98). Die bei den verschiedenen Tierstämmen sehr unterschiedliche Deutlichkeit der Phasen sowie der offensichtliche Einfluß von Injektionsweise und Dosis lassen vermuten, daß der Mehrgipfligkeit der 19S- und 7S- Kurven verschiedene zytokinetische Vorgänge innerhalb jeder Klasse mit je nach Tierstamm deutlich unterschiedenen Dosis-Wirkungskurven zugrunde liegen. In diesem Sinne wären auch Hinweise auf eine den Veränderungen der Plaquezellzahlen synchrone Mehrphasigkeit der Gesamtzellzahlen (59) zu deuten.

Biphasisch ist auch der Verlauf der Serum-Hämolysintiter. Synchron mit den Plaquezahlen wird am 5. Tage ein Maximum von 220E und am 8. Tage ein zweiter Höhepunkt von 50 % des Höchstwertes erreicht. Der streng synchrone Verlauf der zellulären Veränderungen in der Milz mit der Serumtiter-Kinetik sowie die gleiche Relation zwischen beiden Phasenhöhepunkten (2,5 : 1 bzw. 2 : 1) beweisen, daß die serologischen Veränderungen ganz überwiegend den zellulären Vorgängen in der Milz entsprechen. Biphasische Vorgänge der Plaquezellproduktion in den peripheren Lymphknoten konnten nach i.v.-Injektion von 2 x 10^8 Schaferythrozyten bei der Schweizer Albinomaus nicht nachgewiesen werden (93). Die serologische Latenzzeit beträgt 3 Tage, der Wert weicht im Gegensatz zu dem der zellulären von den Angaben der Literatur ab. Bei der CBA-Maus werden übereinstimmend Serumhämolysine nach der gleichen Ag-Dosis schon am 2. Tage nachgewiesen (51,60). Auch bei der Schweizer Albinomaus ist die Titerlatenz nach derselben Ag-Dosis und verschiedener Bestimmungsmethode kürzer als 3 Tage, die Applikationsweise ohne Einfluß (96). Die längere Latenzzeit (lag-Phase) der NMRI-Maus dürfte deshalb stammspezifisch sein. Ob der in den vorgelegten Kurven auffällige Unterschied zwischen der zellulären und der serologischen Latenzzeit von ungefähr 48^h einer verschiedenen Empfindlichkeit der beiden Bestimmungsverfahren oder einer Adsorption der ersten freigesetzten Ak-Mengen (60) an die nach i.p.-Injektion etwas verlängert persistierenden Ag-Mengen zuzuordnen ist, läßt sich nicht entscheiden. Jedenfalls ist die Halbwertszeit der ersten nachweisbaren Ak-Mengen kürzer als die die Plaque-Zellen (60). Den Kurven der Literatur

(37,51,59,60) ist ein zu den Plaquezahlen in Beziehung zu setzender 2. Titergipfel nicht zu entnehmen, auch dann nicht, wenn die Zellkurve eindeutig 2-phasisch ist. Die Parallelität von Plaque- und Titerkurven sowie die erwähnte mehrtausendfach größere Aktivität der 19S-Akk erlauben auch den 2. Titergipfel mit den 19S-Akk und nicht mit den zu dieser Zeit einen Höhepunkt (51) erreichenden 7S-Akk in Verbindung zu bringen.

Die Gesamtzellzahlen der Milz unterliegen in unseren Bestimmungen starken individuellen Schwankungen. Eine nach einem Ag-Dosisbereich von mehreren Zehnerpotenzen nachgewiesene ausgeprägte Zweiphasigkeit (60) mit je einem am 5. und 11. Tage ist nicht zu erkennen.

4.5 Der Einfluß der Vor- und Nachbestrahlung auf die Plaque- und Titer-Kinetik (Serie 2, s. 3.3 und Serie 3, s. 3.4):

Bestrahlung mit 250 R 48 Stunden vor Ag-Gabe (Serie 2) bewirkt einen vorübergehenden deutlichen Abfall der Plaquezahlen am 2. und 3. Tage, so daß die aus den Kontrollen bekannte starke Vermehrung der Plaquezellen erst mit einer dreitägigen Verzögerung eintritt. Nach dem excessiven Anstieg zum 4. Tage läuft der Prozeß bis zu dem um 24 Stunden auf den 6. Tag verzögerten Maximum mit der gleichen Geschwindigkeit wie in den Kontrollen. Auf dem Höhepunkt der ersten Phase werden nur etwa 20 % der Plaquezellen unbestrahlter Tiere gebildet. Auch unter diesen Bedingungen ist nach einem starken Abfall zum 7. Tag am 8. - 9. Tage der Gipfel einer zweiten Phase ausgebildet. Ihre absoluten Werte sind wie die des Maximums auf 27 % reduziert, wobei die zahlenmäßige Relation beider Phasen mit 2 : 1 sich nicht wesentlich geändert hat.

In Übereinstimmung mit den Veränderungen der absoluten Plaquezahlen sind die Zeitpunkte des ersten Erscheinens und des Höhepunktes der Serum-Hämolysine um 24 Stunden verzögert und der maximale Titer-Wert im gleichen Ausmaß auf 25 % gesenkt. Auch der Wert des zweiten Titer-Gipfels, der unverändert am 8. Tage liegt, ist auf 25 % reduziert.

Es fällt auf, daß vom 9. Tage ab die Gesamtzellzahl, vom 10. die Plaquezahlen sich normalisiert haben, während gleichzeitig die Serumtiter nicht mehr als 25 % der Kontrollen erreichen. Ob es sich hier um die Manifestation eines funktionellen Schadens der Ak-Synthese oder -Freisetzung der einzelnen Plaquezellen oder um Verkürzung der intravasalen Halbwertszeit der Hämolysine handelt, ist nicht zu entscheiden. Es besteht der Eindruck einer größeren Streuung der Plaquedurchmesser in den späteren Tagen. Während der ersten Phase vom 1. - 6. Tage ist die mittlere Gesamt-Zellzahl der Milz im Vergleich zu unbestrahlten Tieren etwa um die Hälfte vermindert.

Werden dagegen die Tiere erst 48 Stunden nach Ag-Injektion mit der gleichen Dosis bestrahlt (Serie 3), so befindet sich das gewebliche Substrat zu dieser Zeit in der Phase stärkster Plaquezunahme (Zunahmefaktor 7,0). Unter Zugrundelegung einer zumindest vorwiegend exponentiellen Plaquezunahme vom 1. zum 2. Tage errechnet sich eine Generationszeit von etwa 8,5 Stunden und nähert sich damit dem autoradiographisch ermittelten Wert von etwa 7 Stunden (9?). Zu diesem Zeitpunkt ist also die Aktivierung immunologisch kompetenter Zellen und die Proliferation der schon spezifisch determinierten Zellen voll

angelaufen. Der Immun-Prozeß ist damit in das Stadium abnehmender Strahlensensibilität seiner induzierten gegenüber seinen nicht induzierten Zellelementen im lymphoreticulären Gewebe eingetreten. Daher ist im Vergleich zur Vorbestrahlung die Reduktion der absoluten Plaquezahl in den folgenden Tagen geringer und nimmt mit der Annäherung an das auf 76 % der Vergleichswerte und zum 6. Tage um 24 Stunden verzögerte Maximum stetig ab. Die Reduktion hält bis zum 8. Tage an, ohne aber auf dem Höhepunkt der Reaktion am 6. Tage gegenüber dem Verhalten unbestrahlter Tiere statistisch abgrenzbar zu sein.

Die Verminderung ist Folge der Strahlenschädigung, die die Anzahl der proliferierenden Zellen teils reduziert, teils wahrscheinlich nur die Intermitose-Zeit verlängert hat; wie die Betrachtung der täglichen Zuwachsfaktoren zeigt, ist die Verlangsamung der Plaquebildung auf den 2. - 3. Tag zu beziehen. Sie wird offenbar in den folgenden Tagen bis zum Maximum kompensiert, da die täglichen Zuwachsraten sich in der Größenordnung der unbestrahlten Kontrolltiere bewegen.

Der relative Anteil plaquebildender Milzzellen ist am 3. und 4. Tage nach Ag-Gabe gegenüber den Kontrollen nicht erniedrigt und erscheint am 5. Tage sogar erhöht. Diese Erhöhung nimmt an Deutlichkeit bis zum 10. Tage zu. Sie ist Folge der strahlungsbedingten Senkung des Gesamt-Zellgehaltes der Milz in den ersten Tagen, von der besonders die an der Ak-Bildung nicht beteiligten lymphatischen und lymphoiden, weniger die spez. induzierten Zellelemente der Milz betroffen sind.

Die durch Ag-Gabe zur Proliferation und Differenzierung spezifisch induzierte Zellfraktion ist gegenüber Strahleneinwirkung

verhältnismäßig resistent und bleibt nach 250 R zum größten Teil teilungsfähig, wie die gegenüber unbestrahlten Kontrolltieren unveränderten täglichen Zuwachsfaktoren nach dem 3. Tage bis zum Maximum zeigen. Die Kurven der absoluten und relativen Plaquezahlen lassen wie bei Kontrolltieren und bei vorbestrahlten Tieren ebenfalls einen biphasischen Verlauf mit einem zweiten Gipfel am 8. Tage erkennen. Die signifikant stärkere Schädigung durch Vorbestrahlung im Vergleich zur Nachbestrahlung läßt sich auch an den Veränderungen dieses zweiten Gipfels zeigen: Während 1. und 2. Gipfel nach Vorbestrahlung etwa gleichmäßig auf 20 bzw. 26,7 % der Kontrollen gesenkt sind, wird bei Nachbestrahlung eine ebenfalls etwa gleichmäßige Reduktion der 1. Phase auf 76 % und der zweiten Phase auf 89 % nicht bestrahlter Tiere festgestellt. Die Reduktion der Gesamt-Zellzahl beträgt in Übereinstimmung mit den Verhältnissen nach Vorbestrahlung bis zum 6. Tage etwa 50 %. Eine Bedeutung der Lage des Bestrahlungszeitpunktes zur Ag-Gabe für den strahlenbedingten Gesamt-Zellschaden an der Milz ist damit bis zum 6. Tage nicht zu erkennen.

Die anhand der beiden zellulären Parameter zu beweisende stärkere Ausprägung des Vor- im Vergleich zum Nachbestrahlungsschaden läßt sich auch mit Hilfe der Serum-Hämolysin-Titer demonstrieren. Mit einer gegenüber den Kontrollen unveränderten lag-Phase von 3 Tagen scheinen die Serum-Hämolysine mit einem auf 33 % gesenkten Anfangstiter, während nach Vorbestrahlung die lag-Phase auf 4 Tage verlängert ist und der Anfangstiter auf 16 % der Kontrollen reduziert ist. Das Titer-Maximum ist in Übereinstimmung mit der absoluten Plaquezahl um 24 Stunden zum 6. Tage verzögert und im vergleich-

baren Ausmaß auf 65 % herabgesetzt. Es liegt aber doppelt so hoch wie bei den vorbestrahlten Tieren. Ein 2. Gipfel mit 120 E deutet sich am 8. Tage den absoluten Plaquezahlen entsprechend an. Falls die beiden Plaquebildungsgipfel Ausdruck zweier verschiedener Zellclone sind, so ist aus dem gleichen Verhalten gegenüber Vor- und Nachbestrahlung zu folgern, daß die Induktion ihrer Präcursoren innerhalb der ersten 48^h abgeschlossen ist und sie sich danach in der Geschwindigkeit ihrer Proliferation und Differenzierung zu Ak-Bildnern unterscheiden.

Die anhand der serologischen und zellulären Parameter durch Vor- und Nachbestrahlung demonstrierten Unterschiede in der Radiosensibilität des sensibilisierten und des nicht sensibilisierten Organismus sind am Verhalten der Serum-Ak von zahlreichen Autoren nachgewiesen (7,17,96-98). Die Angaben sind aber aufgrund der verschiedenen verwendeten Tierspezies, Ag-Arten- und -Dosierungen, Bestrahlungsdosen- und -schemata sowie der verschiedenen serologischen Parameter (Hämagglutinin, Hämolysin) nur teilweise miteinander vergleichbar. Mit 710 R ist maximale Immundepression bei der Maus nach Bestrahlung innerhalb der 24^h - 5' vor Ag-Gabe erreichbar (106). Bei dieser hohen Dosis sind Begleiterscheinungen an anderen Organen nicht abzutrennen, der Strahlenschaden ist irreparabel. Aus den vorgelegten Ergebnissen geht ein signifikanter, weitgehend reversibler Strahlenschaden nach Bestrahlung 48^h vor Ag-Gabe mit einer wesentlich geringeren Dosis hervor.

Die in zahlreichen Arbeiten mit verschiedenen Tierspezies, Ag-Arten, Bestrahlungsdosen und -schemata im Prinzip bestätigte und mit den hier vorgelegten Ergebnissen der Jerne-Technik

übereinstimmende größere Wirksamkeit der Vorbestrahlung gegenüber der Nachbestrahlung steht in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen einer einzigen Arbeit (107). Der Autor hat die Zahl plaquebildender Milzzellen bei der Maus nach Bestrahlungen 1 Tag vor sowie 1, 3, 6 und 20 Tage nach Ag-Gabe mit 450 R bestimmt. Es kam zu einem Abfall der Plaquezahlen nach allen Zeitpunkten unter den Kontrollwert nicht bestrahlter Tiere. Die verschiedenen zeitlichen Abstände der Bestrahlung zur Ag-Gabe bewirkten keinen Unterschied der Immundepression. Es wird daraus geschlossen, daß nach der Dosis von 450 R ein Sensibilitätsunterschied Ak-bildender Zellen gegenüber nicht induzierten Zellen nicht nachweisbar ist, und daß der von vielen Autoren serologisch beobachtete Unterschied durch die im Verhältnis zu der antikörperproduzierenden Zelle wesentlich längere Halbwertszeit der Serum-Ak vorgetäuscht wird. Da wie oben abgeleitet, während der ersten 8 Tage nach Ag-Gabe der Immunprozeß durch 19S-Ak repräsentiert wird und diese eine minimale Halbwertszeit von 5,4 Stunden haben (60) und zudem nach Bestrahlung ganz überwiegend 19S-Ak gebildet werden (61), ist die Ablehnung eines Sensibilitätsunterschiedes durch Rückschluß aus der Halbwertszeit der Serum-Ak in den ersten 8 Tagen zweifelhaft. In sämtlichen hier vorgelegten Kurven ist die Parallelität der Plaque- und der Titer-Kurven bis in Einzelheiten wie Zweiphasigkeit und gleichmäßige Senkung beider Plaque- und Titer-Gipfel nach Vor- und Nachbestrahlung zu verfolgen. Während der Autor nach einer Bestrahlung mit 450 R, die 1 Tag vor bzw. 1 oder 3 Tage nach Ag-Gabe erfolgt, immer eine Reduktion der Plaquebildung feststellt, beobachten wir nur nach Vorbestrahlung 48^{h} vor Ag-Gabe eine

signifikante Herabsetzung der maximalen Plaquezahlen. Die Bestrahlung mit der gleichen Dosis 48^{h} nach Ag-Gabe erzielt keine gegenüber den Kontrollen signifikante Abnahme der Plaquebildung. Nach Vorbestrahlung müßte nach den gegebenen Modellvorstellungen der 24-Stunden-Wert unter dem der Kontrollen liegen, was durch unsere Beobachtungen nicht bestätigt wird. Diese stark unterschiedlichen Ergebnisse können vor allem durch die in beiden Systemen verwendeten verschiedenen Strahlendosen erklärt werden. Die Vorläufer der antikörperbildenden Zellen (precursorcells) werden in der Milz nach Bestrahlung mit 250 R durch die nachfolgende Ag-Gabe in geringerer Zahl stimuliert als bei Nachbestrahlung. Inwieweit hierfür eine erhöhte Radiosensibilität dieser Vorläuferzellen selbst oder eine Schädigung der immunogenen Funktion der Makrophagen (108-110) verantwortlich ist, ist bislang nicht entschieden. Für eine Schädigung der precursorcells spricht das Absinken der Zellzahl nach dem 1. Tage; durch den proliferativen Ag-Reiz mit Verkürzung der Generationszeit auf 6 - 8 Stunden kommt es zu einer vorzeitigen Manifestation des Schadens nach der 1. - 2. Teilung einer spez. determinierten Zelle. Die anschließend einsetzende excessive Proliferation kann den Strahlenschaden bis zum verzögerten Maximum nicht mehr kompensieren. Treffen dagegen die Strahlen 48 Stunden nach Ag-Gabe auf ein aktiviertes lymphoreticuläres Gewebe, so manifestiert sich der Strahlenschaden in einer Hemmung der nächstfolgenden Zellteilungsschritte, so daß am 5. Tage die absolute Plaquezahl nur 36 % der Kontrollen beträgt. Wegen der wesentlich höheren Ausgangswerte am 2. und 3. Tage und der nach dem 3. Tage normalisierten

Plaquebildungsgeschwindigkeit wird, wenn auch um 24 Stunden verzögert, ein gegenüber den Kontrollen statistisch nicht mehr abgrenzbares Maximum erreicht, das signifikant über dem durch Vorbestrahlung reduzierten Plaquemaximum am gleichen Tage liegt.

4.6 Der Einfluß des unspezifischen Stimulans GAH auf die Plaque- und Titerkinetik (Serie 4, s. 3.5 und Serie 5, s. 3.6)

Der durch die vorgelegten Ergebnisse zytokinetisch und serologisch definierte Immunschaden durch Vorbestrahlung mit 250 R 48^{h} vor Ag-Gabe (Serie 2) erschien als geeignetes Modell zur Untersuchung der eingangs gestellten Frage, ob der auch nach unseren Ergebnissen (Serie 2 und 3) als gesichert anzusehende Unterschied der Strahlenempfindlichkeit des Immunprozesses gegenüber Vor- bzw. Nachbestrahlung eine vom Antigen determinierte, spezifische oder nur ausgelöste, unspezifische Erscheinung ist.

Als Arbeitshypothese wurde die prinzipielle Austauschbarkeit des Antigen in seiner "Schutzfunktion" gegen ein Agens, von dem eine unspezifische Stimulationswirkung und "Schutzfunktion" auf Immunvorgänge zu erwarten war, angenommen.
Den Ergebnissen mit räumlich und zeitlich streng getrennter Injektion von Stimulans und Ag (Serie 4) ist ein eindeutiger stimulatorischer Effekt des GAH auf die zellulären und serologischen Immunvorgänge zu entnehmen. Während des gesamten Versuchszeitraums sind sämtliche Plaque-Werte z.T. in beträchtlichem Maße gegenüber den unbehandelten Kontrollen

erhöht. Der biphasische Grundtyp der Reaktion ist erhalten, das Maximum unverändert am 5. Tage, der 2. Gipfel zum 9. Tage verschoben. Die Betrachtung der täglichen Zuwachsraten ergibt ein den Kontrollen entgegengesetztes Verhalten: die Plaque-Bildungsgeschwindigkeit nimmt bis zum letzten Tage vor dem Höhepunkt der Reaktion zu, nicht ab.

Wurde dagegen der Organismus analog den Verhältnissen bei Nachbestrahlung statt mit Ag am 3. und 8. Tage vor Bestrahlung mit GAH stimuliert, so zeigte sich eine signifikant geringere Immunschädigung als bei Nachbestrahlung für das Maximum der relativen Plaquezahlen (Serie 5). Gegenüber den Kontrollen (Serie 1) war kein Unterschied zu erkennen; die beiden gegensinnigen Agentien Bestrahlung und Stimulation waren in der verwendeten Dosierung einander äquivalent.

Die für die Deutung dieser immunstimulatorischen Wirkung von GAH heranzuziehende Literatur (s. 21) verwendet dieses Stimulans ausschließlich unter den komplizierten Bedingungen räumlicher und zeitlicher Identität von Adiuvans- und Antigen-Injektion in Form eines Metallhydroxid-Antigen-Adsorbates. Dagegen wird im vorliegenden Zusammenhang eine strenge räumliche und zeitliche Trennung der Adiuvans- und der Antigen-Applikation vorgenommen. Damit verlieren zunächst rein physikochemisch bestimmte Vorgänge, wie z.B. die protrahierte Ag-Freisetzung oder etwaige Funktions-Einheiten von Metallhydroxid-Antigen-Adsorbaten (21) ihre Bedeutung. Zwar ist ein über ca. 14 Tage protrahierter Blutspiegel der Partikel des Adsorbens anzunehmen (22), doch ist die Bedeutung etwaiger sekundär gebildeter Erythrozyten-Metallhydroxid-

Adsorbate für die Phagozytose aus quantitativen Gründen unwahrscheinlich. Statt dessen sprechen die Bestrahlungsergebnisse eher für die wesentliche Bedeutung des biologischen Zustandes des Organismus zum Zeitpunkt der Ag-Gabe. Damit stellt sich die Frage nach lokalen und allgemeinen zellulären Veränderungen des Organismus durch subkutane oder intramuskuläre Metalloxidadsorbat-Injektionen. Kaninchen und Meerschweinchen bilden nach subkutaner Applikation von Diphtherietoxoid- bzw. Eialbumin-Metalloxidadsorbaten lokal und in den regionären Lymphknoten reichlich Makrophagen, die zum Teil verschlepptes Metallhydroxid enthalten. Ebenso treten Formen der Plasmazellreihe auf, die im Gegensatz zu den stets antikörperfreien Makrophagen fluoreszenz-mikroskopisch nachweisbare Antikörper enthalten (26,28). Die Plasmazellen der regionären Lymphknoten erschienen wesentlich eher als diejenigen des Injektionsortes. Dieser Effekt hielt über mehrere Wochen an. Ohne Adiuvans dagegen traten nach einmaliger Injektion wesentlich höherer Ag-Mengen nur ganz flüchtig antikörperhaltige Zellen in den regionären Lymphknoten auf (26,27).

Da eingehendere zytologische und zytokinetische Studien der sensibilisierten und der normalen Milz nach Metallhydroxid-Stimulierung fehlen, werden zum Vergleich die nach anderen unspezifischen Stimulantien beobachteten Reaktionen herangezogen. Die Veränderungen (7) in regionären Lymphknoten nach s.c.-Injektion von Kohlesuspension bestehen bei der Ratte im wesentlichen in einer Transformation der kleinen lymphoiden Reticulum-Zellen von ihrer "Ruheform" zur "Entwicklungsform" (7), die Proliferation dieser als pluripotent geltenden Form wird eingeleitet. Sie sind die unmittelbaren Vorfahren der

frühen Stadien von Lymphozyten- und Plasmazellen und verglichen mit den Ruheformen weniger strahlensensibel. Nach Ag-Gabe (Brucella melitensis-Ag) tritt zu den prinzipiell gleichen Vorgängen noch die frühzeitig einsetzende Proliferation der Plasmazellen.

Eine vergleichende zytologische Studie (111) über Milz- und Leberveränderungen ergibt drei verschiedene Hyperplasiebilder in der Milz nach Dimethylaminoazobenzen, Methylzellulose und Zymosan. Alle drei Substanzen sind ebenso wie Kohlesuspensionen Stimulatoren der RHS-Funktion (112-114). Während DAB in der roten Milzpulpa eine kräftige Hyperplasie und Hypertrophie der Endothel- und Reticulumzellen, Methylzellulose eine Hyperplasie durch Proliferation von vielkernigen Schaumzellen des Fremdkörpertyps, Reticulumzellen und Makrophagen verursacht, ist nach Zymosan dagegen nur eine Proliferation vielkerniger Riesenzellen zu sehen. Parallel zu allen drei Hyperplasieformen waren gewisse histochemische Zeichen vermehrter Zellaktivität gegeben.

Der funktionelle Effekt des Zymosans auf das RHS besteht in einer verstärkten Phagozytose, gemessen an der intravasalen Kohle-Clearence (115). Daß diese Phagozytose über eine vermehrte Ag-Clearence oder -Anreicherung in der Milz für den deutlichen stimulatorischen Effekt dieser Substanz auf die Hämolysinreaktion der Ratte gegen Schaferythrozyten von Bedeutung ist, läßt sich nach Ergebnissen mit Cr^{51}-markierten Erythrozyten (115) ausschließen. Eher scheint das Zymosan den Makrophagen und Ag-sensitiven Zellen gemeinsame Vorläuferzellen zu aktivieren (115).

Bei der Bewertung der durch die Metallhydroxidpartikel in den regionären Lymphknoten des Injektionsortes ausgelösten Vermehrung speichernder Makrophagen ist zwar die dort im Vergleich zur Milz wesentlich höhere Partikelkonzentration zu berücksichtigen, dennoch ist aufgrund der Teilchengröße des GAH in seiner Elution aus dem Depot (22) in der Milz eine Aktivierung phagozytierender Elemente (Retikulumzellen?) anzunehmen. Ob diese aktivierten Formen dann selbst durch Teilnahme an der Ag-Aufschlüsselung als Makrophagen oder aufgrund einer pluripotenten Stammzellfunktion den Immunprozeß fördern, ist gegenwärtig nicht zu entscheiden. Außerdem ist denkbar, daß die nach Perfusionsversuchen an der Milz (11_6) notwendigen aus der Peripherie einwandernden Lymphozyten und ihre Vorstufen nach Vorstimulierung vermehrt aus den regulären Lymphknoten des Injektionsortes in die Milz einwandern und die Plaque-Kinetik zusätzlich beeinflussen.

Die große Bedeutung der Makrophagen und ihrer Funktion für den Immunprozeß wird jedenfalls in letzter Zeit in stärkerem Maße betont (117-120). Auch dieser Zelltyp ist offenbar wie die lymphoide Retikulumzelle von einer gewissen Strahlenresistenz, dies gilt besonders für die digestive Funktion (121). Der enge Kontakt der sich in der Milz differenzierenden und wandernden Vorläuferzellen mit Makrophagen (80) ist das morphologische Äquivalent.

Da der gesamte biphasische Reaktionsverlauf nicht wesentlich deformiert, sondern nur quantitativ nach Stimulation verändert ist, ist auch aus diesem Grunde die Wirkung dieses Adiuvans auf die initialen Reaktionsschritte des Immunpro-

zesses bzw. das gewebliche Differenzierungsmuster in der Milz zum Zeitpunkt der Ag-Gabe wahrscheinlich.

5. These

Für die Deutung der größeren Wirksamkeit der Vor- im Vergleich zur Nachbestrahlung sind Ag und unspezifische Reizsubstanz als gleichwertige Agentien aufzufassen, deren Applikation im Organismus zu zellulären Differenzierungen führt, die eine relativ strahlenresistente Zellfraktion hervorbringen. Die Bestrahlung 48 Stunden nach Ag-Gabe trifft daher ebenso wie Bestrahlung 3 - 8 Tage nach unspezifischer Stimulation auf ein aktiviertes relativ strahlenresistenteres Gewebe als die Bestrahlung eines normalen Gewebes 48 Stunden vor Ag-Gabe. die vorgelegten Ergebnisse bieten keinen Hinweis für die Existenz einer besonderen radiosensiblen Phase oder für die radioprotektive Bedeutung des Ag. Vielmehr ist der zytologische Status des lymphoreticulären Gewebes mit seinen reticulären lymphoiden und lymphatischen Zellen zum Zeitpunkt der Strahleneinwirkung, der durch den unspezifischen Reiz und das Ag ausgelöste Differenzierungsvorgänge bestimmt wird, bestimmend.

Zusammenfassung

Die unterschiedliche Empfindlichkeit des Immunprozesses gegenüber Ganzkörperbestrahlung vor bzw. nach Ag-Gabe wird auf der zellulären und serologischen Ebene vergleichend untersucht. Dann wird der Einfluß des Impfstoff-Adiuvans Gamma-Aluminiumhydroxid (GAH) auf den Immunprozeß ermittelt. Die Wirkung von GAH auf den Immunschaden nach Bestrahlung vor Ag-Gabe wird geprüft. Als Modell dient die Hämolysinbildung gegen 4×10^8 i.p. injizierte Schaferythrozyten in der Milz der NMRI-Maus. Die Reaktion wird vom 1. - 10. Tage mit der Agar-Plaque-Technik nach Jerne und der Hämolysintiter-Bestimmung nach Taliaferro verfolgt - 250 R einer 200-kV-Röntgenstrahlung werden 48^h vor bzw. nach Ag-Gabe verabfolgt. GAH wird als gealterte Suspension, die in 100 g eine 10 g Al_2O_3 äquivalente Menge Tonerde-Gel enthält, am 10. und 5. Tage vor Ag-Gabe bzw. am 5. und 3. Tage vor Bestrahlung zu je 0,1 ml in beide Hinterläufe i.m. injiziert.

Schon bei nicht experimentell sensibilisierten Tieren sind ca. $0{,}8 \times 10^{-3}$ ‰ Milzzellen zur 19-S-Hämolysinbildung befähigt; dem entspricht eine mittlere Häufigkeit von 200 ± 40 Plaques/Milz.

Plaques-Zahlen und Serum-Titer folgen vom 1. - 10. Tage nach Ag-Gabe synchron einem biphasischen Kurventyp mit einem Hauptmaximum von $8{,}2 \times 10^4$ Plaques/Milz und 320 Hämolysin-Titer-Einheiten (HE) am 5. Tage und einem Nebenmaximum von $3{,}0 \times 10^4$ Plaques/Milz und 160 HE am 8. Tage. Die zelluläre Latenzzeit ist kleiner als 24^h, die serologische etwa 3 Tage.

Nach Bestrahlung vor Ag-Gabe wird nach einem vorübergehenden Absinken der Plaques-Zahlen am 2. und 3. Tage das Hauptmaximum um 24^h auf den 6. Tag verzögert und auf 18 % der Kontrollen reduziert; der Effekt ist für die Wertegruppe aus Maximum, vorausgehendem und folgendem Tag signifikant ($p < 0.01$). Auch das Nebenmaximum tritt mit einer Verzögerung von 24^h auf und erreicht nur 28 % der Plaques-Zahlen unbestrahlter Tiere. Die Serumhämolysine erscheinen erst am 5. Tage und erreichen ihr auf 25 % der Kontrollen reduziertes Maximum ebenfalls erst am 6. Tage.

Bestrahlung nach Ag-Gabe bewirkt dagegen nur eine Verzögerung des Plaques-Maximums zum 6. Tage; seine Reduktion auf 75 % der Kontrollen ist nicht signifikant, doch ist der Wert gegenüber dem Verhalten nach Vorbestrahlung signifikant weniger gesenkt. Auch das Nebenmaximum ist um 24^h hinausgeschoben, aber nur um 10 % reduziert. Die Hämolysine erscheinen wie bei unbestrahlten Tieren am 4. Tage, ihr um 36 % verringertes Maximum ist in Übereinstimmung mit den Plaques-Werten zum 6. Tage verschoben.

Unspezifische Stimulierung mit GAH vor Ag-Gabe führt dagegen zu einer Steigerung der Plaques-Bildung in der Milz während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Das Hauptmaximum am 5. Tage ist um 220 %, das Nebenmaximum um 70 % höher als bei unbehandelten Tieren. Die Werte des Maximums und der Wertegruppe aus 4., 5. und 6. Tag sind hochsignifikant gesteigert. Die

Hämolysintiter haben dementsprechend am 5. Tage ihr um 200 % erhöhtes Maximum; sie erscheinen wie bei unbehandelten Tieren nicht vor dem 4. Tage.

Werden stimulierte Tiere vor Ag-Gabe bestrahlt, so liegt das Plaques-Maximum auf dem 6. Tage und erreicht nur 15 % des Wertes nur stimulierter Tiere mit hoher Signifikanz; am 5., 6. und 7. Tage werden aber signifikant mehr Plaques-Zellen als nach alleiniger Vorbestrahlung gebildet. Das Verhalten dieser kombiniert vorbehandelten Tiere ist von dem der Kontrollen statistisch nicht zu trennen. Das Nebenmaximum der Plaques-Zahlen liegt unverändert am 8. Tage und ist auf 70 % der Kontrollen vermindert. Im Serum erscheinen die Ak wie bei Kontrollen am 4. Tage; sie erreichen ihr Maximum übereinstimmend mit den Plaques-Werten am 6. Tage mit einem Titerwert von 280 E, das sind 87 % der Kontrollen. Stimulierung mit GAH am 10. und 5. Tage vor Ag-Gabe und 250 R einer 200 kV-Röntgenbestrahlung 48^{R} vor Ag-Gabe sind also in ihrem Einfluß auf die Hämolysin-Reaktion der NMRI-Maus einander gegensinnig wirkungsgleich.

Sämtliche Serien zeigen eine strenge Synchronizität ihrer Plaques- und Titerverläufe; danach ist auch nach i.p. Ag-Applikation die Milz als der überwiegende Bildungsort der Serumhämolysine anzunehmen.

Der immunstimulatorische Effekt des GAH wird in einem Proliferationsreiz auf die relativ strahlenresistenten pluripotenten lymphoiden Reticulumzellen der Milz gesehen. Ob diese Zellen aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit zu Makrophagen oder zu Ag-sensitiven Elementen den Immunprozess fördern, bleibt ungeklärt. Die beschriebene Wirkungsweise des GAH wäre in Theorien über die Wirkungen von Metallhydroxid-Impfstoffadsorbaten zu berücksichtigen. Aufgrund der erhobenen Befunde und den Ergebnissen der Literatur wird die Vermutung ausgesprochen, daß die verminderte Strahlensensibilität des spezifisch aktivierten Milzgewebes im Vergleich zum nicht aktivierten ein zwar Ag-ausgelöstes, nicht aber spezifisch determiniertes Phänomen ist. In dieser Auswirkung auf die Strahlensensibilität des Milzgewebes ist das Ag austauschbar gegen einen reproduzierbaren unspezifischen Reiz.

L i t e r a t u r

(1) Taliaferro, W.H., Taliaferro, L.G. and B.N. Jaroslow: Radiation and Immune Mechanisms,,Academic Press, New York and London, 1963

(2) Stender, H.St.: Die Wirkung ionisierender Strahlen auf Immunprozesse, Marburger Sitzungsberichte, 85: Heft 1, 1963, p. 19 - 38

(3) Makinodan, T.: Changes in immunbiological processes saused by radiation, in: Handbuch der Medizinischen Radiologie, Bd. II/2 (Ed. A. Zuppinger), p. 303 - 333, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1966

(4) Makinodan, T., Gengozian, N., and C.C. Congdon: Agglutinin procuction in normal, sublethally irradiated, and lethally irradiated mice treated with mouse bone marrow, J. Immunol., 77: p. 250 - 287, 1956

(5) Benjamin, E., and e. Sluka: Antikörperbildung nach experimenteller Schädigung des hämatopoetischen Systems durch Röntgenstrahlen, Wien. klin. Schnschr., 21: p. 311 - 314,1908

(6) Läwen, A.: Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten röntgenisierter Tiere gegen bakterielle Infektionen unter besonderer Berücksichtigung der Bildung spezifischer Antikörper, Mitt. Grenzgeb.Med.Chir., 19: p. 141-186, 1909

(7) Strauch, D., Stender, H.St., and H. Winter: Effects of a nonspezific stimulation on tissue radiosensitivity durung the course of antibody production, J.Immunol., 82: p.298-303, 1958

(8) Pillemer, L.: The nature of the properdin system and its interactions with lipopolysaccharide. Ann.New York Acad. Sci., 66: p. 233-245, 1956

(9) Jerne, N.K., Nordin, A.A., and C. Henry: The agar-plaque-technique for recognisizng "antobody producing cells", in: Cell Bound Antibodies (Ed. by B. Amos and H.Koprowski) p. 109 - , Wister Academic Press, 1963

(10) Silverman, M.S., and P.H. Chin: The effect of whole body X-irradiation of mice immunity to tetanus toxoid; I. The effectiveness of pre- and postirradiation injections of tetanus toxoid with respect to the development of immunity, J. Immunol. 75, p. 321-325, 1955

(11) Fitch, F.W., Wissler, R.W., Lavis, M., and B. Parker: The timing of antigen injection relative to whole body X-irradiation and the development of circulating antibody and the splenic histologic reaction in the rat, J. Immunol., 76: p. 151 - 160, 1956

(12) Heineke, H.: Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf Tiere, Münch.med.Wschr., 50: p. 2090-2092, 1903

(13) McMaster, P.D., and S.S. Hudack; The formation of agglutinins within lymphnodes, J.Exp.Med. 61: p. 783-805, 1935

(14) Fagraeus, A.: Antibody production in relation to the development of plasmacells, Acta.med.scand., 130, Suppl: 204, 1948

(15) Hektoen, L.: Further studies on the effects of the Röntgen ray on antibody production, J.Infect.Dis., 17: p. 28-33, 1915

(16) Dixon, F.J., Talmage, D.W., and P.H. Maurer: Radiosensitive and radioresistant phases in the antibody response, J.Immunol., 68: p. 693-700, 1954

(17) Taliaferro, W.H., Taliaferro, L.G., and E.F. Janssen: The localisation of X-ray injury to the initial phases of antibody response, J.Infect.Dis., 91: p. 105-124, 1952

(18) Stender, H.St., Strauch, D., and H. Winter: Effects of nonspecific agents on antibody response in irradiated animals, in: The Effects of Ionising Radiations on Immune Processes (Ed. by Charles A. Leone), p. 315-334, Gordon and Breach Science Publishers, New York, 1962

(19) Cutler, J.L.; The effect of zymosan on hemolysin production by the rat, Fed.Proc., 18: p. 33, 1959

(20) Symposium on Natural Resistance to Infection, Ann. New York Acad. Sc., 66: p. 233-214, 1956

(21) Haas, R.; und R. Thomssen: Über den Entwicklungsstand der in der Immunbiologie gebräuchlichen Adluvantien, Ergebn. Mikrobiol., 34: p. 27-119, 1961

(22) Stöckle, W., Zacherl, M., und K. Lebeda: Über die Wirkungsweise von Aluminium-Adsorbatvakzinen, Hoppe-Seylers Z. physiol.Chemie, 289: 233-244, 1952

(23) Eisler, M.; Über die Wirkungsweise der Adjuvantia, Z.Immun. Forschung, 117: 294-300, 1959

(24) Cohrs, P., und F. Schulte: Zur differentialdiagnostischen Bedeutung der Aluminium-Hydroxydgranulome, Mh.Vet.-Med.,6: 105, 1951

(25) Holt, L.B., and J.M. Barnes: Quantitative studies on diphtheria prophylaxis: The determination of the antigenicity characteristics of purified diphtheria toxoid in simple solution and in P.T.A.P., Brit. J.Exp.Path., 36: 407, 1955

(26) White, R.G., Coons, A.H., and J.B. Connolly: Studies on antibody production: III. The alumgranuloma, J.Exp.Med., 107: p. 73-82, 1955

(27) Coons, A.H., White, R.G., and J.B. Connolly: Studies on antibody production: IV. The role of a wax fraction of M. tuberculosis in adiuvant emulsions on the production of antibody to egg albumin, J.Exp.Med., 102: p. 83-114, 1955

(28) Coons, A.H., Leduc, E.H., and J.M. Connolly: Studies on antibody production: I. A method for the histochemical demonstration of specific antibodies and its application to a study of the hyperimmune rabbit, J.Exp.Med., 102: p. 49 - 60, 1955

(29) Leduc, E.H., Coons, A.H., and J.M. Connolly; Studies on antibody production: II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit, J.Exp.Med., 102: p. 61 - 72, 1955

(30) Attardi, G., Cohen, M., Horivata, K., and E.S. Lennox: On the analysis of antibody synthesis at the cellular level, Bact.Rev. 23: p. 213 - 223, 1959

(31) Berenbaum, M.C.; The autoradiographic localisation of intracellular antibody, Immunology, 2: p. 71-83, 1959

(32) Mäkelä, O., and G.J.V. Nossal: Bacterial adherence: a method for detecting antibody production by single cells, J.Immunol., 87: 447 - 456, 1961

(33) Schwartz, S.A., and W. Braun: Bacteria as an indicator of formation of antibodies by single spleen cells in agar, Science, 149: p. 200, 1965

(34) Nota, N.R., Briot, M., Stiffel, C., and G. Biozzi: Limmunocyto-adherence: une méthode simple et quantitative pour létude simple in vivo des cellules productrices dánticorps, C.R.Acad.Sci. (Paris), 259: 1277 - 1280, 1964

(35) Zaalberg, O.B.; A simple method for detecting single antibody forming cells, Nature, 202: 1231, 1964

(36) Dresser, D.W., and H.H. Wortis: Nature (London), 208: 859, 1965

(37) Sterzl, J., and I. Riha: Nature (London), 208: 858, 1965

(38) Weiler, E., Melletz, E.W., and E. Breuninger-Peck: Facilitation of immune hemolysis by an interaction between red cells-sensitizing antibody and gamma-globulin allotypic antibody, Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.), 54: p. 1310-1317, 1965

(39) Cunningham, A.J.: A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells, Nature (London), 207: 1106 - 1107, 1965

(40) Merchant, B., T. Hraba; Lymphoid cells producing antibody against simple haptens: detection and enumeration, Science, 152: 1378 - 1379, 1966

(41) Walsh, P., Maurer, R., and M. Egan: Detection of immune response against synthetic polymers of amino acids employing the plaque forming cell system: I. Reaction with sheep erythrocytes coated with polymer, J.Immunol., 98: 344-350, 1967

(42) Berglund, St.E., Markey, P.A., and St.E. Mergenhagen: Observations on the kinetics of hemolytic antibody response by localized hemolysis in gel over frozen sections of mouse spleen, P.S.E.B.M., 126: 84 - 88, 1967

(43) Baker, P.J., Bernstein, M., Pasanen, V., and M. Landy: Detection and enumeration of antibody-producing cells by spezific adherence of antigen-coated betonite particles, J. Immunol., 97: 767 - 777, 1966

(44) Ingraham, J.S., A. Bussard: Application of a localized hemolysin reaction for specific detection of individual antibody forming cells, J.Exp.Med., 119: 667-684, 1964

(45) Landy, M., Sanderson, R.P., and A.L. Jachson; Humoral and cellular aspects of the immune response to the somatic antigen of Salmonella enteritidis, J.Exp.Med., 122: 483-504, 1965

(46) Halliday, W.J., and M. Webb: A plaque technique for counting cells which produce antibacterial antibody, Austr.J. Exp.Biol. and Med.Sci., 43: 163 - 166, 1965

(47) Strander, H.: Studies on cells producing hemolytic antibodies against sheep red blood cells in short term experiments in vitro, Immunology, 10: 45 - 55, 1966

(48) Binet, J.L., and A. Bussard: Etude au microscope electronique des cellules productrices d'hemolysin isolée dans un gel, Nouv.Rev.franc.Hémat., 4: 409 - 420, 1964

(49) Fitch, F.W., Rowley, D.A., and S. Coulthard: Ultrastructure of antibody forming cells, Nature (London), 207: 994-995,1965

(50) Harris, T.N., Hummeler, K., and S. Harris: Electron microscopic observations on antibody producing lymph node cells, J.Exp.Med., 123: 161 - 171, 1966

(51) Hege, J.S., and L.J. Cole: Antibody plaque forming cells: Kinetics of primary and secondary responses, Immunol., 96: 559 - 569, 1966

(52) Humprey, J.H., and R.R. Dourmashkin: Electron microscopic studies on immune cell lysis, in: Complement (Ed. by G.E.W. Wolstenholme and J. Knight), p. 175, Churchill, London, 1965

(53) Borsos, T., and H.J. Rapp: Complement fixation on cell surface by 19S und 7S antibodies, Science, 150: 505-506, 1965

(54 Möller, G., and H. Wigzell: Antibody synthesis at the cellular level: Antibody induced suppression of 19S and 7S antibody response, J.Exp.Med., 121: 969 - 989, 1965

(55) Fishman, M., and F.L. Adler: Antibody formation initiated in vitro: II. Antibody synthesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic acid derved from macrophages incubated with antigen, J.exp.Med. 117: 595-603

(56) Wiedermann, G., Miescher, P.A., and E.C. Franklin: Effect of mercaptoethanol on complement binding ability of human 7S-gamma-globulin, Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.), 113: 609 - 613, 1963

(57) Nagashima, H., Wiedermann, G., Hermann, G., and P.A. Miescher: Influence of 2-mercaptoethanol treatment on opsonizing activity of human and rabbit 7S-antibodies, Vox sang (Basel), 10: 333 - 340, 1965

(58) Styk, B,, Závada, J., and L. Hána: The role of non specific serum factors in the antibody response to the phi-chi-174 bacteriophage, Folia microbiol., 9: 263 - 268, 1964

(59) Wortis, H.H., Taylor, R.B., and D.W. Dresser: Antibody production studied by means of the LHG-assay: I. The splenic response of CBA-mice to sheep erythrocytes, Immunology, 11: 603 - 616, 1966

(60) Wigzell, H., Möller, G., and B. Andersson: Studies at the cellular level of the 19S immune response, Acta path. et microbiol.scandinav., 66: 530 - 540, 1966

(61) Adler, F.L.: Studies on mouse antibodies: I. The response to sheep red cells, J.Immunol., 95: 26 - 36, 1965

(62) Schrek, R.A.: A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions, Americ.J.Cancer, 26: 389 - 392, 1936

(63) Wigzell, H.: Antibody synthesis at the cellular level: some studies on natural anti-sheep red cell antibodies in the mouse, J.Immunol., 97: 608 - 611, 1966

(64) Sterzl, J., Vesely, J., Jilek, M., and L. Mandel: The inductive phase of antibody formation studied with isolated cells, in: Molecular and Cellular Basis of Antibodyformation, Academic Press, New York, p. 463, 1964

(65) Szenberg, A., A.J. Cunningham; DNA synthesis in the development of antibody forming cells during the early stages of the immune response, Nature, 217: 747 - 748, 1968

(66) Bussard, A., and C. Hannoun: Examen des immunocytesen culture in vitro: individualisation fonctionelle et identification morphologique, Compt.rend.Acad.Sc.Paris, 260: 6486 - 6498, 1965

(67) Cunningham, A.J., Smith, J.B., and E.H. Mercer: A method for elestron microscopic examination of antibody producing cells, Immunology, 11: 515 - 517, 1966

(68) Neil, A.L., and F.J. Dixon: Immunohistochemical detection of antibodies in cell tranfer studies, Arch.Path., 67: 643, 1959

(69) Baney, R.N., Vazquez, J.J. and F.J. Dixon: Cellular proliferation in relation to antibody synthesis, Proc.Soc.Exp. Biol. and Med., 109: 1 - 4, 1962

(70) Zlotnik, A., Vazquez, J.J., and F.J. Dixon: Mitotic activity of immunologically competent lymphoid cells transferred into X-irradiated recipients, Lab.Invest., 11, 493-499, 1962

(71) Holub, M.: Potentialities of the small lymphocyte as revealed by homotransplantation and autotransplantation experiments in diffusion chambers, Ann.New. York Acad.Sc., 99: 477- 488, 1962

(72) Claflin, A., and O. Smithies; Antibody cells in division, Science, 157: 1561 - 1562, 1967

(73) Dutton, R.W., and R.I.Mishell: Cell population and cell proliferation in the in vitro response of normal mouse spleen to heterologous erythrocytes. Analysis by the hot pulse technique, J.Exp.Med., 126: 443 - 454, 1967

(74) Dutton, R.W., and R.I. Mishell: Proliferation and differentiation in the immune response, in: Symposium on Cytoplasmatic and Environmental Influences on Nuclear Behaviour of the Society of General Physiologists. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J. 19, 1967

(75) Drescher, J., D. Jacherts: Antikörpersynthese in vitro: III. Bildung eines Antikörper-analogen Produktes (AAP) nach Stimulierung mit Influenza-Virus, Ztrlblt.Bak.Paras.kd.Inf.u. Hyg., 199: 316 - 328, 1966

(76) Jerne, N.K., Nordin, A., Henry, C., Funi, H., and A. Koros: Inf.Exchange Group Nr. 5 (Immunopathol.), Memo No. 46, 1965

(77) Nossal, G.J.V., and O. Mäkelä; Autoradiographic studies on the immune response: I. The kinetics of plasma cell proliferation, J.Exp.Med., 115: 209 - 230, 1962

(78) Balfour, B.M., Cooper, E.H., and E.L. Alpen: Morphological and kinetic studies on antibody-producing cells in rat lymph nodes, Immunology, 8: 230 - 244, 1965

(79) Kennedy, J.C., Till, J.E., Siminovitch, L., and E.A. McCulloch: The proliferative capacity of antigen sensitive precursors of hemolytic plaque-forming cells, J.Immunol., 96: 973 - 980, 1966

(80) Pettersen, J.C., Borgen, D.F., and K.C. Graupner: A morphological and histochemical study of the primary and secondary immune response in the rat spleen, Am.J.Anat., 121: 305 - 317, 1967

(81) Tannenberg, W.J.K.: Inducition of 19S-antibody synthesis without stimulation of cellular proliferation, Nature, 214: 293 - 295, 1967

(82) Monod, J., and M. Cohn: La biosynthesis induite des enzymes (adaptation enzymatique), Adv. in Enzymol., 13: 67-119, 1952

(83) Cohn, M.: Contributions of studies on the beta-galactosidase of Escherichia coli to our understanding of enzyme synthesis, Bacteriol.Rev., 21: 140 - 168, 1957

(84) Cunningham, A.J., Smith, J.B., and E.H. Mercer: Antibody formation of single cells from lymph nodes and efferent lymph of sheep, J.Exp.Med., 124: 701 - 714, 1966

(85) Cunningham, A.J and A. Szenberg: Further improvements in the plaque-technique for detecting single antibodys forming cells Immunol., 14: 599 - 600, 1968

(86) Fishman, M.: Antibody formation in vitro, J.Exp.Med., 114: 837 - 865, 1961

(87) Celada, F., and Wigzell, H.; Immune responses in spleen colonies: I. Clonal distribution of hemolytic plaque forming cells, Immunology, 10: 231 - 243, 1965

(88) Cohen, E.P., and J.J. Parks: Antibody production by non immune spleen cells incubated with DNA from immunized mice, Science, 144: 1012 - 1013, 1964

(89) Friedman, H.: Antibody plaque formation by normal mouse spleen cell cultures exposed in vitro to RNA from immune mice, Science, 146: 934 - 934, 1964

(90) Cannon, D.C., R.W. Wissler: Spleen cell migration in the immune response of the rat, Arch.Path., 84: 109 - 117, 1967

(91) Jerne, N.K.: Studies on the primary response of mice, in: The cellular and molecular basis of antibody formation. (Ed. by Stěrzlet al.) Publishing house of the Czechoslovak Academy of Science, Prague, 459, 1965

(92) Friedman, H.: Distribution of antibody plaque forming cells in various tissues of several strains of mices injected with sheep erythrocytes, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 117: 526-30, 1964

(93) Eidinger, D., and H.F. Pross: The immune response to sheep erythrocytes in the mouse: I. study of the immunological events utilizing the plaque-technique, J.Exp.Med., 126: 15 - 33, 1967

(94) Finkelstein, M.S. and J.W. Uhr: Specific inhibition of antibody formation vy passively administered 19S and 7S antibody, Science, 146: 67 - 69, 1964

(95) Langevoort, H.L.: Histophysiology of antibody response: 1. Histogenesis of plasma cell reaction in rabbit spleens, Lab.Invest., 12: 106 - 118, 1963

(96) Wissler, R.W. et al.: Cellular basis of antibody formation, J.Cell.Comp.Physiol. (suppl 1), 50: 265, 1957

(97) Möller, G.; 19S antibody production against solubie lipopolysaccharide antigens by individual lymphoid cells, Nature (London), 207; 1166

(98) Britton, S. and G. Möller: Homeostatic mechanisms in antibody production against E.coli lipopolysaccharide antigen, in: Symposium on the mutation process, section 4, (Ed. by M. Hasek), Prague, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1966

(99) Cannon, D.C.; Cell migration from rat spleen in immune rasponse, Fed.Proc., 23: 345 - 360, 1964

(100) Cannon, D.C., and R.W. Wissler: Migration of spleen cells into the blood stream following antigen stimulation of the rat, Nature, 207: 654 - 655, 1965

(101) La Via, M.F., Barker, P.A., and R.W. Wissler: A study of the correlation of antigen phagocytosis and the splenic histologic reaction with antibody formation in protein-depleted rats, J.Lab.Clin.Med., 48: 237 - 254, 1956

(102) Capalbo, E.E. and T. Makinodan: Doubling time of mouse spleen cells during the latent and log phases of primary response, J.Immunol., 92; 234- 242, 1964

(103) Dixon, F.J., Talmage, D.W. and P.H. Maurer: Radiosensitive and radioresistant phases in the antibody production, J.Immunol., 68: 693 - 700, 1952

(104) Simic, M.M., Bljivic, V.S., Petrovic, M.Z., and D.M. Cirkovic: Antibody formation in irradiated rats, Belgrad 1965

(105) Makinodan, R., and N. Gengozian: Primary antibody response to a distantly related heterologous antigen during maximum depression period after varying doses of X-radiation, J.Immunol., 81: 150 - 154, 1958

(106) Makinodan, T., and N. Gengozian: Effects of radiation on antibody formation, in: Radiation protection and recovery, (Ed.A. Hollaender), Pergamon Press, New York, 316 - 351, 1960

(107) Berenbaum, MC.:Radiosensitivity of immunological by activated cells, Nature (London), 209: 1313 - 1315, 1966

(108) Donaldson, D.M., Marcus, S., Gyi, K., and E.H. Perkins: The influence of immunisation and total body X-irradiation on intracellular digestion by peritoneal phogocytes, J.Immunol., 76: 192 - 199, 1956

(109) Galliley, R., and M. Feldman: The role of makrophages in the induction of antibody in X-irradiated animals, Immunology, 12; 197 - 206, 1967

(110) Jacherts, D.: Antikörpersynthese in vitro: VI. Die manifeste und die latente Funktion der informatorischen RNS in der Milz, Z.Med.Mikrobiol.Immunol., 152: 262 - 272, 1966

(111) Machado, E., Lozzio, B.B., and M. Royer: Cellular modification of the reticuloendothelial system submitted to different stimulants, J.Reticoloendothelia Soc., 5: 297-312, 1968

(112) Kampschmidt, R.F., Clabaugh, W.A., and H.I. Arredondo: Phagocytosis of colloidal carbon by the reticuloendothelial system during hepatocarcinogenesis of the rats, Proc.Soc. Exptl.Biol.Med., 108: 216 - 219, 1961

(113) Blickens, D.A., and N.R. Di Luzio: The effects of methylcellulose on the reticoloendothelial system, J.Reticuloendothelial Soc., 1: 68 - 76, 1964

(114) Heller, J.H.: Reticuloendothelial structure and function: A Symposium, Ronald Press, New York, 1968

(115) Cutler, J.L.; The enhancement of the hemolysin productions in the rat by zymosan, J.Immunol., 84: 416 - 419, 1960

(116) Ford, W.L., and J.L. Gowans: The role of lymphocytes in antibody formation: The influence of lymphocyte migration on the initiation of antibody formation in the isolated, perfused spleen, Proc.Roy.Soc, 8: 1968, 244 - 262, 1967

(117) Adler, F.L., Fishman, M., and S. Dray: Antibody formation initiated in vitro: III. Antibody formation and allotypic specificity directed ribonucleic acid from peritoneal exudate cells, J.Immunol., 97: 554 - 558, 1966

(118) Mollo, F., Governi, M., Cilali, C., and M. Dellepiane: Experimental observation on the participation of makrophages in the mechanism of antibody production, Experientia, 19: 582 - 583, 1963

(119) Askonas, B.A., and J. M. Rhodes: Immunogenicity of antigen-containing riboucleic acid preparations from makrophages, Nature (London), 205: 470 - 474, 1965

(120) Pribnow, J.F., and M.S. Silverman; Studies on the radiosensitivity phase of the primary antibody response in rabbits: I. The role of makrophages, J.Immunol., 98: 225-229, 1967

(121) Perkins, E.H., Nettesheim, P., and T. Morita: Radioresistance of the engulfing and degradative capacities of peritoneal phagocytes to kiloröntgen X-ray doese, J.Reticuloendothelial Soc., 3: 71 - 82, 1966

Danksagung

Mein besonderer Dank für die bereitwillige Hilfe bei der Durchführung der Arbeit gilt folgenden Herren:

Herrn, Prof. Dr. H. St. Stender für die Überlassung des Themas und stete Förderung,
Herrn Prof. Dr. Siegert, Direktor des Hygiene-Instituts der Philipps-Universität Marburg, für die Erlaubnis zur Herstellung der Agarplatten in seinem Institut,
Herrn Laborant Winson, Hygiene-Institut der Philipps-Universität, für die unermüdliche Hilfe bei der Herstellung von Agar und Nährmedien,
Herrn Dr. Th. Peters, Universität Gießen, für die Anfertigung der Mikrophotographien.

Lebenslauf

Am 28.10.1937 wurde ich in Bremen als einziger Sohn des damaligen Reichsbank-Oberinspektors W.E. Röseler und seiner Ehefrau Liebhilde geb. Schubert geboren. Nach dem Besuch der Grundschule in Landsberg/W. und Ahstedt/Krs. Marienburg trat ich 1949 in die damalige Oberrealschule für Jungen a.d. Dechanatstraße in Bremen ein. Dort legte ich Ostern 1957 die Reifeprüfung ab. Das Studium der Medizin begann ich an der Philipps-Universität Marburg Mai 1958. Nach klinischem Studium an den Universitäten Göttingen, Zürich und des Saarlandes in Homburg bestand ich im Februar 1964 das Medizinische Staatsexamen in Marburg. Anschließend an die Ausbildung bis zum Assistenz-

arzt im Kreiskrankenhaus Waldbröl/Rhld. trat ich im Frühjahr 1967 die Stelle eines Verwalters einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an der Medizinischen Hochschule, Institut für klinische Radiologie, unter Herrn Prof. H. St. Stender an.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Marburg: Berendes, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimmroth, Du Mesnil de Rochemont, Exner, Förster, Gedigk, Hartmann, Hensel, Huber, Jacob, Linneweh, Mahr, Niessing, Petry, Pirson, Schwaiger, Schmidt, Seidel, Siegert, Straub, Walcher.

Göttingen: Gruber, Hallermann, Hellner, Linzbach, Okonek, Schön, Schwab.

Zürich: Ackerknecht, Bleuler, Fanconi, Leuthardt, Major, Rossier, Schinz, Schwarz, Sennig, Ühlinger, Zollinger.

Homburg/Saar: Fischer, Kreibig, Limburg, Löw, Mayer, Maurer, Meyer, Nödl, Rotter.